

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA**

Lucenara dos Santos Pereira

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE POROS NAS MEMBRANAS
PLASMÁTICA E NUCLEAR DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA
ISOLADA DURANTE A NANOELETROPORAÇÃO**

Florianópolis

2017

Lucenara dos Santos Pereira

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE POROS NAS MEMBRANAS
PLASMÁTICA E NUCLEAR DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA
ISOLADA DURANTE A NANOELETOPORAÇÃO**

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica do Centro
Tecnológico da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Elétrica.
Orientador: Profª. Daniela Ota
Hisayasu Suzuki, Dra.

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Pereira, Lucenara dos Santos
ESTUDO DA FORMAÇÃO DE POROS NAS MEMBRANAS
PLASMÁTICA E NUCLEAR DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA ISOLADA
DURANTE A NANOELETOPORAÇÃO / Lucenara dos Santos
Pereira ; orientadora, Daniela O. H. Suzuki, 2017.
134 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. eletroporação. 3.
membranas de células biológicas. 4. densidade de
poros. 5. modelagem matemática. I. Suzuki, Daniela
O. H. . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.
III. Título.

Lucenara dos Santos Pereira

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE POROS NAS MEMBRANAS
PLASMÁTICA E NUCLEAR DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA
ISOLADA DURANTE A NANOELETROPORAÇÃO**

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica, área de concentração Processamento de Informação, subárea Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 03 de março de 2017.

Prof. Marcelo Lobo Heldwein, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:

Profª. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente da banca e Orientadora

Banca Examinadora (continuação):

Prof. Euler de Vilhena Garcia, Dr.
Universidade de Brasília

Profª. Christine Fredel Boos, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Marino Neto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, alicerce da nossa existência, que me protegeu, confortou e fortaleceu para eu chegar até aqui.

Agradeço a minha orientadora Daniela Suzuki, que esteve sempre presente em todas as etapas deste trabalho, incentivando e apresentando os caminhos com dedicação e paciência.

Agradeço a minha família, minha mãe Cleusa, meu pai Álvaro, meu irmão Alessandro, minha irmã Cleonara, minha sobrinha Giovana e meu cunhado Amaro. Pessoas que estão sempre presentes na minha vida, e que me deram suporte afetivo e financeiro ao longo desta caminhada.

Agradeço a todos os amigos, colegas e professores do IEB-UFSC, pelos ensinamentos transmitidos e companheirismo em todos os momentos, em especial ao Jorge.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo analisar a formação de poros nas membranas plasmática e nuclear de uma célula biológica isolada, durante a aplicação de campos elétricos com diferentes configurações de duração e amplitude. Neste sistema, a condutividade da solução na qual a célula está imersa também é variável. A principal hipótese que direcionou este trabalho foi a de que as configurações do pulso elétrico e condutividade da solução podem fazer com que a eletroporação seja predominante na região da membrana plasmática ou da membrana nuclear (eletroporação seletiva). Esta técnica pode ser utilizada na obtenção de acesso ao citoplasma e plasma nuclear, tal como num processo de transferência genética, em que há a necessidade de condução de plasmídeos desde o meio externo até o núcleo celular, sem provocar a morte da célula. Para este estudo, foram aplicados modelos matemáticos da eletroporação, a fim de verificar variações de potencial transmembrana, densidade de poros e condutividade elétrica nas membranas, durante a aplicação dos campos elétricos. Os resultados teóricos obtidos comprovaram a hipótese proposta, apontando que a condutividade externa para valores inferiores às do citoplasma e nucleoplasma (aproximadamente $0,1 S/m$) torna ainda maior o tempo necessário para o carregamento da membrana plasmática em relação à membrana nuclear. Dessa forma, quando pulsos de curta duração (em torno de $10 ns$) e alta intensidade (em torno de $10 kV/cm$) são aplicados, a predominância de poros ocorre na membrana nuclear, processo denominado nanoeletroporação. Além disso, este estudo analisou diferentes características dimensionais das células, tais como espessuras das membranas, raios da célula e do núcleo, condutividades do citoplasma e do plasma nuclear, e ainda as permissividades e as capacitâncias das membranas, a fim de fornecer diretrizes para as configurações dos parâmetros do pulso elétrico e condutividade.

Palavras-chave: eletroporação, célula biológica isolada, membranas plasmática e nuclear, potencial transmembrana, condutividade elétrica, densidade de poros, pulso de nanossegundos, campo elétrico, tempo de carregamento das membranas.

ABSTRACT

This work aims to analyze the pore formation in the plasma and nuclear membranes of a single biological cell, during the application of electric fields with different duration and amplitude configurations. In this system, the conductivity of pore solution in which the cell is immersed is also variable. The main hypothesis that guided this work was that the electric pulse settings and solution conductivity can cause electroporation to be predominant either on the plasma membrane region or the nuclear membrane region (selective electroporation). This technique can be used to obtain access to cytoplasm and nuclear plasma, such as in a genetic transfer process, this process requires plasmids conduction from the external environment to the cell nucleus without cause cell death. For this study, mathematical models of electroporation were applied, in order to verify variations of transmembrane potential, pore density and electric conductivity of the membranes during the applications of the electric fields. The obtained theoretical results suggests the proposed hypothesis, when values of external conductivity is lower than values of cytoplasm and nucleoplasm (approximately $0,1 S/m$), increases the time required of plasm membrane to load in relation to the nuclear membrane. Therefore, when pulses of short duration (around $10 ns$) and high intensity (around $10 kV/cm$) are applied, the predominance of pores occurs in the nuclear membrane, a process known as nanoelectroporation. Furthermore, this study analyzed different cell dimensional characteristics, such as membrane thickness, cell and nucleus radius, cytoplasm and nuclear plasma conductivities, and even permittivity and capacitance of the membranes, to provide guidelines for parameter settings of the electrical pulse and conductivity.

Keywords: electroporation, isolated biological cell, plasma and nuclear membranes, transmembrane potential, electrical conductivity, pore density, nanoseconds pulse, electric field, charging time of the membranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de transferência gênica utilizando eletroporação...	28
Figura 2 - Modelagem da célula como um circuito elétrico passivo linear, com componentes resistivas correspondentes a solução extracelular $R1$, ao citoplasma $R2$ e ao nucleoplasma $R3$. As componentes capacitivas estão nas membranas plasmática Cm e nuclear Cn . As resistências equivalentes descrevem o núcleo $R4$ e a célula $R5$, e ainda tem-se a capacitância equivalente entre eletrodos $C0$	37
Figura 3 - Circuito elétrico parcial da estrutura celular, contendo para a membrana celular a resistência Rm , a capacitância Cm , a condutividade σm e a permissividade ϵm . No citoplasma está a resistência Rc , a capacitância Cc , a condutividade σc e a permissividade ϵc	38
Figura 4 - Geometria celular axissimétrica.	53
Figura 5 - Etapas dos procedimentos empregados. Etapa 1: Definição dos parâmetros iniciais – nesta etapa, são buscados os dados para configurar tanto a geometria celular quanto o modelo matemático. Etapa 2: Estudo dos parâmetros do pulso elétrico – nesta etapa, o tempo de carregamento e a condutividade externa são mantidos fixos, enquanto que os parâmetros amplitude e duração do pulso elétrico são variáveis. Etapa 3: Estudo da condutividade externa – nesta etapa, os parâmetros duração e amplitude do pulso são fixados, assim como o tempo de carregamento das membranas, enquanto varia-se a condutividade externa. Etapa 4: Estudo do tempo de carregamento – nesta etapa são fixados os parâmetros duração e amplitude do pulso elétrico, assim como condutividade externa, sendo apenas variado o tempo de carregamento das membranas.	55
Figura 6 - Curvas de Vm na membrana plasmática obtidas no software MATLAB e através do modelo matemático implementado no COMSOL.	72
Figura 7 - Curvas de Vm na membrana nuclear obtidas no software MATLAB e através do modelo matemático implementado no COMSOL.	72
Figura 8 - Curva dos potenciais transmembranas extraídas de RETELJ <i>et al.</i> (2013).	74

Figura 9 - Curva dos potenciais transmembrana obtidas no software COMSOL com base nos dados de RETELJ <i>et al.</i> (2013).....	74
Figura 10 - Curva dos potenciais transmembranas V_{mp} e V_{mn} para ângulos variando entre 0° e 90° em relação às membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 2 kV/cm e 10 ns	75
Figura 11 - Densidade de poros para as membranas plasmática e nuclear, sujeitas a um campo elétrico de 1 kV/cm e $1 \mu\text{s}$ de duração.....	77
Figura 12 - Densidade de poros nas membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 2 kV/cm e duração de 100 ns	77
Figura 13 - Condutividade elétrica das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns	78
Figura 14 - Densidade de poros das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns	78
Figura 15 - Potencial transmembrana das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns	79
Figura 16 - Resumo dos efeitos nas membranas para os 3 casos estudados. A dimensão das setas indica a predominância de poros em cada membrana para cada configuração de pulso.....	80
Figura 17 - Mapa da nanoeletroporação para a membrana nuclear, considerando $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$. A alta densidade de poros corresponde a 107 vezes mais poros na membrana nuclear do que na plasmática.....	81
Figura 18 - Densidade de poros na membrana nuclear para diferentes condutividades extracelular e pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns	82
Figura 19 - Densidade de poros na membrana plasmática para diferentes condutividades extracelular e pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns	82
Figura 20 - Razão entre as densidade de poros nas membranas para diferentes condutividades extracelular e diferentes razões entre os raios celular e nuclear, para um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns	83

Figura 21 – Relação entre N_{tmn}/N_{tmp} e τ_{mp}/τ_{mn} , para pulsos elétricos curtos e médios, considerando diferentes células biológicas e $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$	87
Figura 22 - Número de poros na membrana nuclear para diferentes razões R_c/R_n , considerando $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns	88
Figura 23 - Número de poros na membrana plasmática para diferentes razões R_c/R_n , considerando $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns	89
Figura 24 – Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações do raio celular, considerando uma célula B16-F1 de $R_n = 2,2 \mu\text{m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	90
Figura 25 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações do raio celular, considerando uma célula B16-F1 de $R_n = 2,2 \mu\text{m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	90
Figura 26 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da condutividade do citoplasma, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_{np} = 2,2 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	92
Figura 27 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da condutividade do nucleoplasma, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_{cit} = 0,25 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	93
Figura 28 – Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da espessura da membrana plasmática, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns ...	94
Figura 29 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da espessura da membrana nuclear, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	95
Figura 30 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da permissividade relativa da membrana nuclear, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns	96
Figura 31 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da permissividade	

relativa da membrana plasmática, considerando uma
célula B16-F1 de $\sigma e = 0,1 S/m$ e um pulso de 12 kV/cm
durante 9 ns..... 96

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
α	Taxa de criação de poros	$m^2 s^{-1}$
C_m	Componente capacitivo da membrana plasmática	F/m
C_n	Componente capacitivo da membrana nuclear	F/m
C_c	Componente capacitivo do citoplasma	F/m
C_0	Componente capacitivo equivalente do sistema entre eletrodos	F/m
d_m	Espessura de uma membrana	m
d_{mp}	Espessura da membrana plasmática	m
d_{mn}	Espessura da membrana nuclear	m
ε_0	Permissividade do vácuo	$N \cdot m^2 \cdot C^{-2}$
ε_{cit}	Permissividade relativa do citoplasma	—
ε_{np}	Permissividade relativa do nucleoplasma	—
ε_m	Permissividade relativa de uma membrana	—
ε_{mp}	Permissividade relativa da membrana plasmática	—
ε_{mn}	Permissividade relativa da membrana nuclear	—
ε_c	Permissividade relativa do citoplasma	—
E_0	Intensidade do campo elétrico aplicado	V/m
E_{cit}	Intensidade do campo elétrico no citoplasma	V/m
η	Profundidade relativa dos poros	—
G_m	Condutância de uma membrana	S
K	Coefficiente particionado do modelo matemático da eletroporação	—
$N(t)$	Densidade de poros	$1/m^2$
N_0	Densidade inicial de poros	$1/m^2$
q	Constante da eletroporação	—

q_e	Carga do elétron	C
r_p	Raio do poro	m
R_1	Componente resistivo do eletrólito	Ω
R_2	Componente resistivo do citoplasma	Ω
R_3	Componente resistivo do nucleoplasma	Ω
R_4	Componente resistivo nuclear	Ω
R_5	Componente resistivo celular	Ω
R_m	Resistência da membrana plasmática	Ω
R_{cit}	Resistência do citoplasma	Ω
R_c	Raio celular	m
R_n	Raio nuclear	m
s	Frequência complexa	—
σ_{m_0}	Condutividade inicial da membrana	S/m
σ_i	Condutividade da solução interna	S/m
σ_0	Condutividade da solução externa	S/m
σ_c	Condutividade do citoplasma	S/m
σ_m	Condutividade da membrana plasmática	S/m
σ_p	Condutividade do poro	
σ_{mp}	Condutividade da membrana plasmática	S/m
σ_{mn}	Condutividade da membrana nuclear	S/m
σ_{c0}	Condutividade inicial da membrana plasmática	S/m
σ_{n0}	Condutividade inicial da membrana nuclear	S/m
σ_{np}	Condutividade do nucleoplasma	S/m
σ_{cit}	Condutividade do citoplasma	S/m
t	Tempo	s
τ	Tempo de carregamento de uma membrana	s
τ_{mp}	Tempo de carregamento da membrana plasmática	s
τ_{mn}	Tempo de carregamento da membrana nuclear	s
θ	Ângulo formado entre o vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana	rad
v_m	Potencial transmembrana adimensional	—
V_m	Potencial transmembrana induzido	V

V_{in}	Potencial no interior da membrana	V
V_{out}	Potencial no exterior da membrana	V
V_{ep}	Tensão característica da eletroporação	V
w_0	Barreira de energia dentro do poro	—

LISTA DE ABREVIACÕES

DNA – Ácido Desoxirribunucleico (do inglês *Desoxirribonucleic Acid*)

GFP – Proteína Verde Fluorescente (do inglês *Green Fluorescence Protein*)

IEB - UFSC – Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

2D – Duas dimensões

AC – Corrente Alternada (do inglês *Alternating Current*)

DC – Corrente Contínua (do inglês *Direct Current*)

PBS – Tampão Fosfato-Salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PBS – Tampão Fosfato-Salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

SHM – Solução eletrolítica denominada *Hepes*

GTM – Solução eletrolítica denominada *Glucose*

ATM – Solução eletrolítica denominada *Adonitol*

STM – Solução eletrolítica denominada *Tris*

SMEM – Solução eletrolítica sem denominação

NTN – Solução eletrolítica sem denominação

NHM – Solução eletrolítica sem denominação

NSTM – Solução eletrolítica sem denominação

NSHM – Solução eletrolítica sem denominação

S5TM – Solução eletrolítica sem denominação

S5HM – Solução eletrolítica sem denominação

SNM – Solução eletrolítica sem denominação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros Selecionados Para Configurar o Modelo Matemático da Eletroporação.	59
Tabela 2 - Configurações do pulso elétrico.	61
Tabela 3 - Parâmetros geométricos empregados para o estudo da influência da duração e amplitude do pulso elétrico, correspondentes às células B16-F1. A condutividade celular foi fixada em $\sigma e = 0,1 S/m$	61
Tabela 4 - Parâmetros geométricos empregados na construção do mapa da nanoeletroporação, correspondentes às células B Normais. A condutividade celular foi fixada em $\sigma e = 0,1 S/m$	62
Tabela 5 – Valores de configuração do pulso elétrico empregados na construção do mapa da nanoeletroporação.	63
Tabela 6 - Configurações de condutividades extracelular.	64
Tabela 7 - Razões entre os raios da célula e do núcleo.	65
Tabela 8 – Dados celulares utilizados para o estudo da relação entre o tempo de carregamento e a nanoeletroporação.	67
Tabela 9 - Dados celulares utilizados para o estudo da relação entre raios celular e nuclear e a nanoeletroporação.	68
Tabela 10 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual dos raios celular e nuclear na nanoeletroporação.	68
Tabela 11 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das condutividades do citoplasma e nucleoplasma na nanoeletroporação.	69
Tabela 12 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das espessuras das membranas plasmática e nuclear na nanoeletroporação.	70
Tabela 13 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das permissividades das membranas plasmática e nuclear na nanoeletroporação.	70

SUMÁRIO

1 Introdução	27
1.1 Objetivos	30
1.1.1 Objetivo geral	31
1.1.2 Objetivos específicos	31
1.2 Justificativa	31
1.3 Organização do trabalho	33
2 Fundamentação Teórica	35
2.1 Características de uma Célula Biológica e Biofísica das Membranas	35
2.2 Circuito Elétrico Equivalente de uma Célula Biológica	36
2.3 Tempo de Carregamento das Membranas	39
2.4 Eletroporação e a Formação de Poros	41
2.5 Nanoeletroporação e Efeitos Secundários	43
2.6 Aplicações da Eletroporação e Nanoeletroporação	45
2.7 Modelagem Matemática da Eletroporação	46
3 Metodologia	49
3.1 Descrição do Modelo Matemático da Eletroporação	49
3.2 Definição da Geometria Celular	52
3.3 Procedimentos Empregados	54
3.3.1 Etapa 1: Definição dos parâmetros iniciais	55
3.3.2 Etapa 2: Estudo dos parâmetros do pulso elétrico	58
3.3.3 Etapa 3: Estudo da condutividade externa	63
3.3.4 Etapa 4: Estudo do tempo de carregamento	65
4 Resultados	71
4.1 Estudo dos parâmetros do pulso elétrico	75
4.2 Estudo da Condutividade Elétrica da Solução	81
4.3 Estudo do Tempo de Carregamento	84
5 Discussões	97
6 Conclusão e Trabalhos Futuros	103
6.1 Trabalhos Futuros	103
Referências	107
Anexo A – Dados de Raios e Espessuras	119

Anexo B – Dados de Condutividades Elétricas	121
Anexo C – Dados de Permissividades Relativas.....	123
Anexo D – Dados de Capacitâncias e Condutâncias.....	125
Anexo E – Tempo de Carregamento das Membranas.....	127
Anexo F – Faixa de Variação dos Parâmetros e Valores Padrões.....	129
Anexo G – Parâmetros do Modelo Matemático da Eletroporação.....	131
Anexo H – Parâmetros para Validação do Modelo Matemático Implementado no COMSOL	133

1 INTRODUÇÃO

A transferência de DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma técnica amplamente utilizada na geração de animais transgênicos¹, a partir da introdução de DNA em ovócitos fecundados. No entanto, ela também possui um grande potencial em aplicações terapêuticas, como o tratamento de distrofias musculares, que são um grupo de doenças genéticas nas quais os músculos que controlam o movimento enfraquecem progressivamente, podendo afetar tanto os músculos de movimentos voluntários quanto involuntários, como o coração (LU *et al.*, 2003; SCHERTZER *et al.*, 2006).

De modo geral, essas e outras aplicações da transferência de DNA tem em comum a necessidade de fazer com que o plasmídeo² transponha duas barreiras até atingir o núcleo. Primeiramente, o plasmídeo² deve atravessar a membrana plasmática e, na sequência, após a migração pelo citoplasma, deve atravessar a membrana nuclear de modo a ser expresso.

Os agentes que constituem ou contêm os genes a serem transferidos e expressos na célula são denominados vetores. Existem vetores virais, que podem ser compostos por fragmentos de DNA de vírus em conjunto com o DNA a ser transferido, ou ainda um DNA viral modificado e empacotado por uma proteína viral, de forma a tornar a partícula viral menos tóxica e não patogênica (HERWEIJER e WOLFF, 2003). Além dos vetores virais, têm-se os vetores químicos, que se caracterizam pela administração de DNA encapsulado, os lipossomos (ANDRE e MIR, 2004). Apesar de este método químico ser mais elaborado e eficiente, ele não apresenta segurança suficiente para ser aplicado *in vivo*.

Idealmente, um vetor deveria ser capaz de acomodar um tamanho ilimitado de DNA, estar disponível em uma forma concentrada, ser facilmente produzido, ser direcionado para tipos específicos de células, ser capaz de impedir a replicação autônoma do gene, apresentar uma garantia de expressão gênica em longo prazo, não oferecer riscos de toxicidade e não ser imunogênico. No entanto, nenhum vetor apresenta

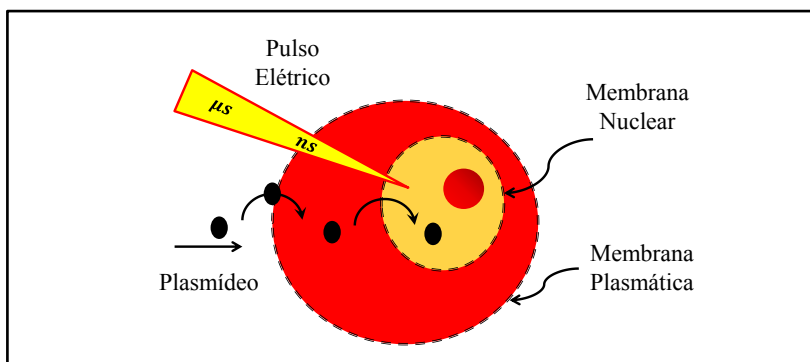
¹ Animais transgênicos: são aqueles que contêm um material genético de outra espécie ou tiveram seu genoma modificado.

² Plasmídeo: segmento de DNA que contém uma sequência genética.

todas essas características, sequer é perfeito em relação a qualquer um desses quesitos (DANI, 1999).

Devido às limitações e riscos inerentes aos vetores virais, foram desenvolvidas técnicas mais simples de transferir genes para células e tecidos, através da inoculação de DNA puro, com técnicas de micro injeção e método biobalístico³ (WHALTER *et al.*, 2002). Atualmente, vem sendo estudado o uso da eletroporação na introdução de transgenes no núcleo, conforme demonstrado na Figura 1, sendo uma técnica que apresenta vantagens de baixo custo, fácil preparo e segurança na produção e utilização, podendo ser considerado como o método não viral que apresenta maior eficiência de transferência gênica (BLOQUEL *et al.*, 2004).

Figura 1 - Processo de transferência gênica utilizando eletroporação.



Fonte: Adaptado de CHOPNET *et al.* (2013).

Sob o enfoque celular, o fenômeno da eletroporação é a aplicação de um campo elétrico na célula, provocando alterações transitórias na permeabilidade e condutividade das membranas plasmática e nuclear, de acordo com as configurações desse campo. Essas alterações podem ser consideradas poros, que facilitam a passagem de moléculas, tais como os plasmídeos. O rompimento do envelope nuclear mantendo a viabilidade celular continua sendo o maior desafio em relação a transferência gênica utilizando eletroporação, e a solução passa pelo estudo das formas de se realizar uma eletroporação

³ Método biobalístico: bombardeamento de genes aderidos a partículas de ouro ou tungstênio para o interior de uma célula.

seletiva nas membranas celulares (ESCOFFRE *et al.*, 2010; KANDUSER *et al.*, 2009).

A eletroporação é composta por uma série de processos com fases distintas. Inicialmente, um pulso com um dado valor de tensão é aplicado na membrana por um determinado tempo, provocando um acúmulo de cargas devido à migração de íons. Quando este acúmulo de carga atinge um limite crítico, a membrana lipídica sofre um rearranjo em sua morfologia, formando um pré-poro e na sequência um poro que permite a passagem de moléculas e íons. Alguns estudos sugerem que esses pré-poros são pequenas deformações hidrofóbicas, de cerca de 3 Å (0,3 nanômetro) de diâmetro. Logo, a transição de um estado não condutor (pré-poros) para um condutor (poros) depende do rearranjo da extremidade do poro, em que as cabeças dos lipídios se dobram para criar uma interface hidrofílica. Ao final do pulso elétrico, os poros se fecham e a estrutura retorna ao seu estado inicial, no caso da eletroporação ser reversível. Ou ainda, no caso da eletroporação irreversível, os poros permanecem abertos ou expandem-se, levando possivelmente a ruptura da célula (MIKLAVCIC e TOWHIDI, 2010).

O que define o destino final do poro é a tensão transmembrana (V_m), que é a diferença de potencial induzida entre as camadas externa e interna da membrana. Considerando uma célula teórica de raio igual a 10 μm , quando esse potencial fica na faixa de $0,2 V < V_m < 1 V$, os poros gerados se fecham ao final do estímulo, restabelecendo a membrana. Já para o caso de V_m ultrapassar 1 V, os poros permanecerão abertos, provocando desequilíbrio iônico, rompimento da membrana e morte celular (SUZUKI, 2009). Essa destruição irreversível das células, apesar de não ser foco da transferência gênica, é uma forma promissora de tratamento de câncer.

No entanto, uma vez que o sucesso das aplicações depende, sobretudo, das propriedades do pulso elétrico, esse deve ser controlado com precisão para a obtenção de um dado resultado. De modo geral, os parâmetros de controle de um pulso DC estão na sua intensidade e duração, enquanto que de um pulso AC estão na amplitude e frequência. Outros fatores que também podem ser controlados são o número de pulsos aplicados e a distância entre eletrodos (STANKEVIC *et al.*, 2013).

Além dos parâmetros relacionados com o pulso elétrico, existe a possibilidade de manipular a condutividade da solução na qual a célula é imersa durante o processo de eletroporação. O objetivo principal, em termos de transferência gênica, é a busca de parâmetros ideais de pulso e

condutividade em que haja a menor lesão celular com a maior quantidade de expressão gênica. Na prática, a avaliação quantitativa do grau de expressão gênica nas diferentes condições experimentais é dada pela observação de uma fluorescência provocada por um marcador de eficiência, como o GFP (*Green Fluorescence Protein*) (SANTRA *et al.*, 2014).

Assim, tendo em vista os aspectos citados a cerca da utilização da eletroporação na transferência gênica e outras aplicações que necessitam da abertura de poros nas membranas celulares, este trabalho se propõe a analisar teoricamente a influência dos parâmetros do pulso elétrico e da condutividade da solução que envolve a célula durante esse processo, a fim de se obter configurações que proporcionem melhores resultados e menos danos para a estrutura da membrana celular.

O maior desafio está na abertura de poros no núcleo, para isso, pretende-se analisar a viabilidade do uso de pulsos de nanossegundos, partindo-se da hipótese de que com este tipo de pulso o aumento da permeabilidade da membrana nuclear e organelas é superior ao da membrana plasmática.

Além dos parâmetros do pulso elétrico e da condutividade extracelular, também serão analisados os efeitos da eletroporação em diferentes células biológicas, com características extraídas a partir de uma revisão bibliográfica. Estas características são espessuras das membranas, raios da célula e do núcleo, condutividades do citoplasma e plasma nuclear, e ainda permissividades e capacitâncias das membranas. Com isso, busca-se mapear a potencialidade da eletroporação seletiva à medida que cada parâmetro da célula varia, relacionando-o com o tempo de carregamento das membranas, que será um aspecto fundamental para o entendimento de todo o processo da nanoeletroporação.

Os estudos a serem realizados são teóricos, e utilizam modelos matemáticos que fornecem resultados quantitativos expressos na forma gráfica, a partir de softwares de simulação. Esses resultados serão analisados a fim de melhor descrever a formação de poros nas membranas, e com isso fornecer diretrizes para a configuração do pulso elétrico e condutividade da solução a partir dos dados intrínsecos a uma determinada célula em uso.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho norteia-se pelos seguintes objetivos.

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é analisar teoricamente o processo de abertura de poros nas membranas plasmática e nuclear de células biológicas isoladas com diversas características dimensionais e elétricas, a fim de verificar a influência da variação dos parâmetros do pulso elétrico e da condutividade da solução externa na formação de poros nas membranas durante a eletroporação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Implementação e validação de um modelo matemático da eletroporação e de uma geometria celular no software COMSOL, a fim de serem estudados o potencial transmembrana, a densidade de poros e a condutividade elétrica nas membranas plasmática e nuclear;
- Análise dos efeitos nas membranas a partir da aplicação de diferentes pulsos elétricos, variando em termos de amplitude e duração, na geometria celular previamente definida;
- Verificação da influência das variações de condutividade da solução externa a célula;
- Estudo da influência das dimensões e características celulares no tempo de carregamento das membranas e, por consequência, na abertura de poros;
- Avaliação da melhor forma de configurar os parâmetros do pulso elétrico e da solução de acordo com determinadas faixas de dimensões e características celulares, a partir da investigação do banco de dados elaborado.

1.2 JUSTIFICATIVA

Estudar o fenômeno da eletroporação a partir da análise da formação de poros não somente na membrana plasmática, mas também na membrana nuclear, é de extrema importância e pode auxiliar inúmeras áreas da medicina e biotecnologia. Uma delas, conforme foi mencionada, é a de transferência gênica (GENG *et al.*, 2012).

No entanto, por se tratar de uma ferramenta não química e não tóxica, ela pode ser utilizada em outras inúmeras aplicações que envolvem o acesso ao citoplasma ou plasma nuclear, como é o caso da inserção ou retirada de moléculas grandes ou pequenas, que podem ser proteínas, íons, drogas ou substâncias impermeáveis. Além disso, é uma forma promissora para cirurgias intracranianas e tratamento de câncer (ELLIS *et al.*, 2011; KOTNIK *et al.*, 2015).

O tratamento de câncer aliando eletroporação e quimioterapia (eletroquimioterapia) é uma das principais motivações dos estudos atuais em eletroporação, devido à melhora na eficiência das drogas utilizadas, decorrentes do aumento da permeabilidade celular. Isso provoca a redução dos efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, fadiga e queda de cabelo (NEAL II *et al.*, 2009; MIR *et al.*, 2006). Convém salientar que a utilização desse método em humanos ainda não é permitida no Brasil, embora esteja em plena expansão na área veterinária.

Apesar dos inúmeros benefícios que a eletroporação pode proporcionar, trazendo melhorias para a qualidade de vida da população, ainda há muitas descobertas que precisam ser feitas, a fim de que a aplicação desse método torne-se cada vez mais segura e eficiente. Dessa forma, diversas pesquisas vêm sendo realizadas, tanto de forma teórica quanto experimental.

O Instituto de Engenharia Biomédica (IEB-UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina possui uma linha de pesquisa voltada para a eletroporação, a níveis de células, suspensões e tecidos. Em parceria com outras universidades e profissionais da área, desenvolve uma série de trabalhos práticos e teóricos que buscam ampliar o conhecimento a cerca do fenômeno, a fim de apoiar a expansão dessa técnica em nível nacional (RAMOS, 2003; SUZUKI, 2009; CHIEA, 2013; GALLINARO, 2014; ANSELMO, 2014; RAMOS, 2016; BERKENBROCK, 2016). Nesse contexto, surge este trabalho de cunho teórico em nível celular.

A importância de estudos teóricos, envolvendo modelagem matemática e simuladores, como é o caso desse trabalho, está pautada principalmente na exigência de menos recursos do que seria necessário para uma investigação experimental e na possibilidade de supor regimes anormais ou extremos de funcionamento de um dado processo. Além disso, a utilização de modelos matemáticos vem sendo favorecida pelo desenvolvimento de novas tecnologias, softwares e métodos de cálculo, que otimizam o processo de busca pelos resultados.

Dentre as pesquisas teóricas na área de eletroporação, os efeitos de pulsos elétricos de duração na ordem de poucas dezenas de nanossegundos e intensidades que atingem escalas de MV/m vêm recebendo considerável atenção por parte da comunidade científica, e representa a possibilidade de abertura de poros seletiva nas membranas. A utilização de pulsos ultracurtos não somente permite introduzir um novo conjunto de interações célula-campo elétrico, mas também pode abrir portas para uma gama de aplicações terapêuticas que requerem a aplicação de energia eletromagnética dentro da célula ou tecido, em pontos que não são facilmente acessíveis por eletrodos de agulha, por exemplo.

No entanto, não foram encontrados trabalhos que explicassem de forma detalhada o processo de formação de poros de acordo com as características dimensionais das células, o que remete ao conceito de tempo de carregamento das membranas, que será analisado ao longo deste estudo, na expectativa de serem definidas melhores formas de configuração da condutividade extracelular e do pulso elétrico. A maioria dos trabalhos aborda somente as características do pulso elétrico, de forma relativamente superficial, e há divergências entre aqueles que abordam a influência da condutividade celular (NAPOTNIK *et al.*, 2016).

Portanto, o desenvolvimento desse trabalho irá contribuir para o avanço dos estudos na área de nanoeletroporação, tendo como meta servir de auxílio para futuros estudos experimentais que venham ser desenvolvidos em relação a esse tema, tanto no IEB-UFSC quanto em outros locais onde há interesse no assunto.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho está organizado em cinco capítulos. Na Introdução é apresentado o problema a ser tratado, sua justificativa e os objetivos do trabalho.

O segundo capítulo apresenta a Fundamentação Teórica, iniciando com uma breve apresentação das características de uma célula biológica e da biofísica das membranas. Na sequência, é apresentada uma descrição celular sob a forma de circuitos elétricos, o que conduz para o estudo do tempo de carregamento das membranas, essencial para o entendimento da nanoeletroporação. Por fim, o processo de eletroporação já discutido brevemente na Introdução é retomado, e

alguns conceitos são analisados com mais profundidade, bem como as aplicações dessa técnica.

O terceiro capítulo aborda a Metodologia empregada neste trabalho, descrevendo o modelo matemático a ser utilizado, a geometria celular, a forma como foi composto o banco de dados com parâmetros dimensionais da célula e ainda como foram os procedimentos de testes.

O quarto capítulo apresenta os resultados obtidos através da implementação da metodologia, incluindo os efeitos da configuração da amplitude e duração do pulso elétrico, da condutividade externa a célula e também da variação de cada parâmetro da geometria celular.

O quinto capítulo contém as discussões a cerca dos resultados obtidos, tendo em vista o que foi proposto nos objetivos, utilizando a metodologia descrita.

Por último, tem-se o capítulo de conclusão, onde estão as considerações finais a respeito do trabalho. Ainda neste capítulo, estão as propostas para a continuação desta pesquisa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os conceitos necessários que servirão de aporte ao desenvolvimento da metodologia proposta neste trabalho são apresentados neste capítulo.

2.1 CARACTERÍSTICAS DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA E BIOFÍSICA DAS MEMBRANAS

Um sistema celular é composto por um conteúdo interno aquoso denominado citoplasma, no qual diferentes organelas estão em suspensão, tais como núcleo, lisossomos, mitocôndrias, dentre outras. Ao redor do citoplasma está a membrana plasmática, que representa uma barreira entre o interior e o exterior da célula, atuando como apoio mecânico e proteção do conteúdo celular. Do mesmo modo, a maioria das organelas também possui estrutura semelhante. No núcleo, por exemplo, seu conteúdo é denominado nucleoplasma ou plasma nuclear, e é recoberto pela membrana ou envelope nuclear (LODISH, 2008).

As membranas plasmática e nuclear são constituídas por bicamadas fosfolipídicas, compostas por cabeças hidrofílicas (grupo fosfato) orientadas para a parte externa da membrana, enquanto que as caudas hidrofóbicas (cadeias de ácidos graxos) estão voltadas para a parte interna. Nessa bicamada, geralmente existem proteínas ATPases ou transportadoras, as quais se unem aos íons e formam um complexo capaz de se mover através da fase lipídica e transpassar a membrana, denominado canal iônico. Alguns exemplos de canal iônico são os canais de sódio, potássio, cálcio e cloreto (MAZZANTI *et al.*, 2001).

Quando o poro aquoso de um determinado canal iônico é aberto, por mudanças conformacionais na estrutura da proteína, ocorre um fluxo seletivo de milhões de íons através da membrana. Este movimento iônico produz uma corrente elétrica, que inclusive pode ser registrada, demonstrando a atividade elétrica de um único canal ("*single-channel*"), que fornece informações a cerca das modificações da proteína ou do complexo molecular que forma o canal iônico. Essa técnica de registro, denominada *patch-clamp*, consiste na excitação de um pequeno fragmento da membrana, assim como de todo o sistema de transporte que atua nessa região, mantendo tal fragmento selado à ponta de uma

pipeta e realizando as devidas medições (MAGISTRETRI *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2010).

O controle do processo de abertura e fechamento dos canais iônicos é feito através do mecanismo denominado “*gating*”, a partir de estímulos por meio de mensageiros químicos (canais dependentes de ligante) ou de tensão (canais dependentes de tensão) (TANG *et al.*, 2006). Dessa forma, as diferentes concentrações de íons carregados eletricamente nos lados intra e extra celular implicam em um determinado potencial elétrico em cada um desses lados, cuja diferença entre eles é denominada potencial transmembrana, conforme Eq. 1:

$$V_m = V_{in} - V_{out} \quad (1)$$

sendo que V_{in} é o potencial intracelular e V_{out} é o potencial extracelular.

Todas as células apresentam um determinado valor de potencial transmembrana que tende a estar em equilíbrio quando não há estímulo elétrico, que é o potencial de repouso. Definido como zero o potencial do lado externo da membrana, o seu interior apresenta valores em média entre -60 mV (axônios dos neurônios, por exemplo) e -90 mV (como é o caso de células musculares). Uma forma de efetuar a medição do potencial de repouso é através da inserção no interior da célula de capilares de ponta extremamente fina e com solução eletrolítica, que captam a pequena diferença de potencial entre os meios intra e extra celular e enviam esse sinal para ser amplificado e mostrado em um osciloscópio (AGARWAL *et al.*, 2007). O conceito de potencial transmembrana é de extrema importância para o entendimento do fenômeno da eletroporação, que será discutido mais adiante.

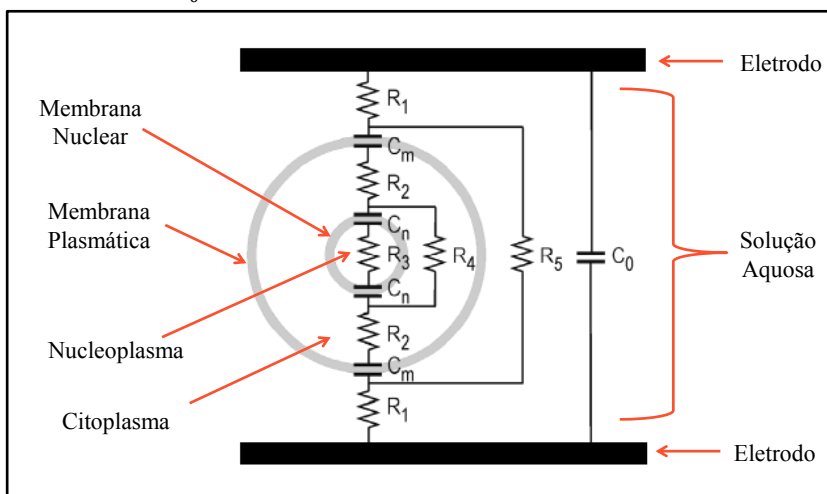
Além do ponto de vista biológico, outro aspecto importante para o estudo da eletroporação é a descrição dessa estrutura celular do ponto de vista de um circuito elétrico, o que possibilita uma melhor compreensão a cerca dos efeitos resultantes da aplicação de um pulso elétrico.

2.2 CIRCUITO ELÉTRICO EQUIVALENTE DE UMA CÉLULA BIOLÓGICA

Uma célula biológica pode ser descrita na forma de um circuito elétrico, em que suas estruturas são modeladas como componentes passivos, de acordo com suas características. Dessa forma, as

membranas da célula e do núcleo são consideradas como capacitores, e o citoplasma e o nucleoplasma como resistores. A partir dessa ideia geral, tem-se na Figura 2 a composição do circuito elétrico para o caso de uma célula única isolada, sendo demonstrado somente o núcleo em seu interior. A consideração de uma célula única contendo somente o núcleo não prejudica o estudo, já que o equacionamento para as membranas da célula e do núcleo pode ser expandido para as membranas das demais organelas. Além disso, a Figura 2 inclui também a resistência e capacitância da solução na qual esta célula estaria imersa durante um experimento (SCHOENBACH *et al.*, 2007).

Figura 2 - Modelagem da célula como um circuito elétrico passivo linear, com componentes resistivas correspondentes a solução extracelular R_1 , ao citoplasma R_2 e ao nucleoplasma R_3 . As componentes capacitivas estão nas membranas plasmática C_m e nuclear C_n . As resistências equivalentes descrevem o núcleo R_4 e a célula R_5 , e ainda tem-se a capacitância equivalente entre eletrodos C_0 .

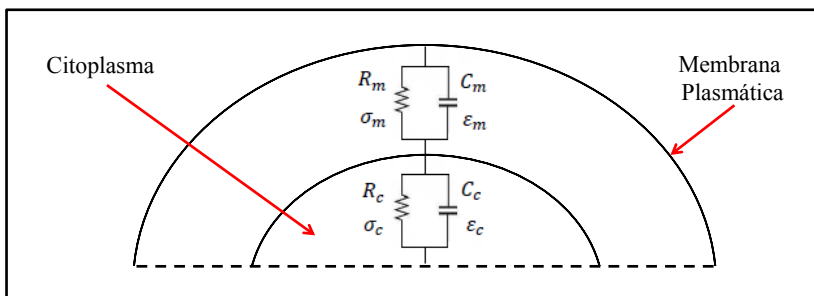


Fonte: Adaptado de SCHOENBACH *et al.* (2007).

No entanto, esse modelo da célula não é suficiente para o estudo do fenômeno da eletroporação de forma ampla, pois se restringe a algumas faixas de intensidade e duração de campo elétrico aplicado. Portanto, um circuito que complementa o modelo anterior deve considerar também as permissividades, condutividades e capacitâncias das membranas plasmática e nuclear, assim como do citoplasma e

nucleoplasma. Na Figura 3 tem-se a disposição desses elementos para a membrana plasmática e o citoplasma. As demais membranas e seus conteúdos têm seus respectivos componentes dispostos de forma semelhante.

Figura 3 - Circuito elétrico parcial da estrutura celular, contendo para a membrana celular a resistência R_m , a capacitância C_m , a condutividade σ_m e a permissividade ε_m . No citoplasma está a resistência R_c , a capacitância C_c , a condutividade σ_c e a permissividade ε_c .



Fonte: Adaptado de SCHOENBACH *et al.* (2007).

De acordo com a Figura 3, o componente capacitivo C_m da membrana é devido à bicamada fluidica de lipídios com características isolantes que atua como o dielétrico de um capacitor, separando as soluções condutoras dos meios intra e extra celular. Embora o citoplasma tenha uma estrutura diferente da membrana, ele também apresenta uma certa capacitância C_c , que é devida a sua capacidade de armazenar cargas elétricas recebidas (RUBINSKI, 2007).

Por sua vez, os componentes de resistência elétrica R_m da membrana e R_c do citoplasma são devidos ao fato desses meios se oporem ao movimento das cargas que tendem a transpô-los. Além disso, ao ser considerada a permissividade ε_m da membrana e ε_c do citoplasma, é possível verificar como um campo elétrico quando aplicado afeta esses meios e como eles se polarizam ao receber esse campo (RUBINSKI, 2007).

A medida da capacidade da membrana e do citoplasma conduzirem corrente elétrica é dada através das condutividades. Em relação às condutividades da membrana σ_m e do citoplasma σ_c , o citoplasma e o nucleoplasma são moderadamente condutivos, enquanto que as membranas tem uma baixa condutividade. Isso torna a célula um

condutor dentro de um envelope isolado, contendo organelas com propriedades similares (RUBINSKI, 2007).

As propriedades dielétricas de uma célula são alteradas quando há a exposição a um campo elétrico suficientemente forte (da ordem de kV/cm ou mais) e com duração inferior a milissegundos. Assim, a permeabilidade é modificada e poros são abertos, caracterizando a “eletroporação” ou “eletropermeabilização” (KOTNIK *et al.*, 2012).

De maneira geral, quando a membrana recebe um estímulo elétrico, inicia-se um processo de carregamento, devido as suas características capacitivas. A duração total para que esse processo se realize por completo é denominada tempo de carregamento de uma membrana e indica o tempo que seria necessário para essa membrana carregar.

Cada membrana apresenta certo valor de tempo de carregamento, que depende de suas características intrínsecas. Assim, a análise desse conceito e a obtenção dos dados que permitem o seu cálculo possibilitam uma adequada configuração da duração do pulso elétrico a fim de atingir um dado objetivo. Definindo a duração do pulso para valores abaixo ou acima do tempo de carregamento de uma dada membrana é possível obter uma eletroporação seletiva, fazendo com que a predominância da abertura de poros seja mais evidente em uma dada região da célula.

2.3 TEMPO DE CARREGAMENTO DAS MEMBRANAS

Uma vez que a membrana apresenta predominantemente características capacitivas, é de extrema importância abordar o conceito de tempo de carregamento, pois é nesse aspecto que está a diferença fundamental entre a eletroporação e a nanoeletroporação.

O tempo de carregamento de uma membrana plasmática ou nuclear pode ser descrito por (SUZUKI, 2009):

$$\tau = R_c \cdot C_m \frac{\sigma_i + 2\sigma_0}{2 \cdot \sigma_i \cdot \sigma_0 + R_c \cdot G_m \cdot (\sigma_i + 2 \cdot \sigma_0)} \quad (2)$$

sendo que C_m é a capacitância da membrana, G_m é a condutância da membrana intacta, R_c é o raio da célula, σ_i e σ_0 são as condutividades interna e externa da membrana, respectivamente, e σ_m é a condutividade da membrana (SUZUKI *et al.*, 2011).

O valor da capacitância pode ser obtido por:

$$C_m = \frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_0}{d_m} \quad (3)$$

onde ε_m e ε_0 são as permissividades da membrana e vácuo, respectivamente, e d_m é a espessura da membrana.

A condutância G_m é dada por:

$$G_m = \frac{1}{d_m} \sigma_m \quad (4)$$

Devido a essas características, os tempos de carregamento das membranas plasmática e nuclear apresentam diferenças, sendo que a tendência é que o tempo da nuclear seja inferior ao tempo da plasmática. De acordo com essa informação, um pulso de curta duração que eletropora a membrana nuclear pode não ser suficiente para atingir o tempo de carregamento da membrana plasmática e eletroporá-la. Por outro lado, se o pulso for de longa duração, ele vai atingir a membrana plasmática e carregá-la. No entanto, ocorrerão poucos efeitos na membrana nuclear e organelas (FOSTER, 2000; IVORRA *et al.*, 2010).

Esse processo descrito é válido em condições ideais. Porém, em condições não ideais, mesmo com pulsos mais longos também são esperados efeitos nas organelas, devido às pequenas variações de potencial transmembrana nessas regiões que ocorrem durante o estímulo elétrico. Mesmo que as membranas não sejam totalmente carregadas, elas iniciarão esse processo e sofrerão algumas modificações. Esses efeitos vão se ampliando à medida que o pulso é reduzido, até tornarem-se predominantes nas membranas internas.

Esse aspecto é o que gera a hipótese deste estudo, a qual pressupõe que um processo de transferência de material desde o meio externo até o núcleo pode ser realizado em duas etapas. Na primeira seria aplicado um pulso elétrico de microssegundos a fim de realizar a eletroporação da membrana plasmática e conduzir o material até o citoplasma. Na segunda etapa, seria aplicado um pulso de nanossegundos, partindo-se da ideia inicial de que com esta característica não haveria tempo suficiente de carregamento da membrana plasmática e os poros seriam abertos predominantemente no núcleo celular. Porém, como será visto o longo deste estudo, outros fatores também afetam a nanoeletroporação, como a condutividade extracelular e as características geométricas da célula.

2.4 ELETROPORAÇÃO E A FORMAÇÃO DE POROS

Um processo clássico de eletroporação na membrana plasmática refere-se à criação de vias aquosas que atravessam a membrana através da bicamada lipídica, quando campos elétricos são aplicados. Assim, permite-se que moléculas hidrofílicas de tamanhos razoáveis passem através da membrana. Esse fenômeno ocorre em regiões da membrana plasmática que atingem certo potencial induzido que ultrapassa um dado limiar, que depende de vários parâmetros. Dentre eles, pode-se citar o tipo de célula (tamanho, forma, estado fisiológico ou patológico), configuração do pulso que gera o campo elétrico (intensidade, duração, geometria do eletrodo, *in vitro* ou *in vivo*, dentre outros) (AGARWAL *et al.*, 2007; KOTNIK *et al.*, 2003).

A eletroporação reversível explora a natureza relativamente fraca das interações da bicamada fosfolipídica hidrofóbica/hidrofílica e sua habilidade de recuperação espontânea após a perturbação. Porém, se o campo elétrico está acima de um valor crítico para a célula na qual é aplicado, há uma perturbação definitiva das áreas da membrana, levando a morte celular e consequente necrose do tecido, no caso de uma célula animal, o que caracteriza uma eletroporação irreversível. Logo, quando o objetivo é haver uma eletroporação reversível, a magnitude do campo elétrico deve ser suficientemente elevada para causar aumento da permeabilidade e condutividade elétrica da membrana e abrir poros, porém inferior à tensão que provoca danos irreversíveis (PAVLIN e MIKLAVCIC, 2009).

O limiar de tensão transmembrana que delimita a eletroporação reversível e irreversível na membrana plasmática depende das características celulares, assim como em cada uma das membranas das organelas. Um valor típico desse limiar é de 0,2 a 0,5 V para o início da abertura de poros e 1,0 V para o processo se tornar irreversível. Quando a célula não é estimulada eletricamente, as tensões de repouso das membranas são insuficientes para ocasionar uma eletroporação natural (KOTNIK *et al.*, 2012).

Para elevar o potencial transmembrana da membrana plasmática de uma célula e atingir os limiares de tensão que provocam a eletroporação, geralmente são utilizados pulsos retangulares unipolares, com amplitudes de algumas centenas de volts por centímetro e duração de algumas dezenas de microssegundos até milissegundos, e tempos de subida de microssegundos de duração (WU *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013). A exposição a esse tipo de pulso elétrico provoca uma

tensão na membrana plasmática da ordem de várias centenas de milivolts, que persiste até o final do pulso.

Assim, o potencial transmembrana induzido pelo campo elétrico altera a permeabilidade da membrana, fazendo com que poros transitórios sejam formados. Durante e após a aplicação do pulso, esses poros passam por um processo dinâmico de evolução, que pode ser definido em três etapas. Inicialmente, na primeira etapa, que engloba os primeiros milissegundos de exposição ao pulso, os poros são abertos com diâmetros inferiores a 2 nm e se expandem até atingir diâmetros de 20 a 40 nm. Na segunda etapa, que ocorre após alguns segundos do processo, os poros se expandem ainda mais, podendo chegar até 100 nm e tornando-se relativamente estáveis. Por fim, num tempo que pode durar de segundos a minutos, os poros começam a sofrer um processo de fechamento, se reduzindo ao longo do tempo. No entanto, alguns poros mesmo estando parcialmente fechados ainda podem ter um longo tempo de vida (CHANG, 1991).

A expansão dos poros justifica o motivo pelo qual os genes podem transpor a membrana e penetrar na célula durante a eletroporação, mesmo sendo considerados moléculas de diâmetro elevado. Antes do estudo de (CHANG, 1991), acreditava-se que o diâmetro dos poros não ultrapassava 1 nm, o que inviabilizava a passagem de macromoléculas. Esse valor de 1 nm era baseado em pesquisas envolvendo o transporte de moléculas de carboidratos em hemácias eletropermeabilizadas. Porém, os dados eram obtidos vários minutos após as células serem eletroporadas, quando uma boa parte dos poros já estava parcialmente fechada, o que obviamente indicava que eles apresentavam tamanhos bem reduzidos (HABERL *et al.*, 2013; KOTNIK *et al.*, 2015).

No entanto, mesmo que já tenha sido provado que o tamanho dos poros abertos é suficiente para a passagem de macromoléculas, ainda há muitas descobertas a serem feitas a fim de melhor controlar a aplicação dos pulsos elétricos, sobretudo os de menor duração e maior intensidade. A partir da revisão bibliográfica realizada ao longo deste trabalho, não foi encontrada uma forma concreta de calcular a duração adequada do pulso, o que há são indicações do comportamento da membrana nas faixas de micro e nano segundos. Além disso, o processo de desencadeamento da formação de poros, assim como as demais fases da eletroporação, ainda encontram limitações para seu estudo.

Algumas limitações estão relacionadas as medições em tempo real deste fenômeno ultra rápido e em escala subcelular, além da falta de

geradores de pulsos elétricos e microeletrodos adaptados para a microscopia. O uso do microscópio óptico é inviabilizado pelo tamanho dos poros, enquanto que a preparação de amostras para o microscópio eletrônico se torna um tanto agressiva para a estrutura metaestável das membranas. Esses fatores limitam a investigação prática em escala microscópica, sobretudo quando o núcleo celular está envolvido.

Atualmente, para identificar acontecimentos no interior da célula é utilizada a microscopia de fluorescência. No entanto, a limitação desse método é que alguns marcadores não podem ser utilizados em organismos vivos, em técnicas *in vitro* ou *in vivo*. De modo geral, a inserção de moléculas exógenas pode afetar o metabolismo celular mesmo em baixas concentrações.

Portanto, o uso de estudos teóricos ainda predomina na nanoeletroporação, como é denominado o campo de pesquisa que aborda os efeitos de campos elétricos de curta duração (nanossegundos) nas membranas celulares.

2.5 NANOELETROPORAÇÃO E EFEITOS SECUNDÁRIOS

Conforme descrito anteriormente, os efeitos induzidos pelo campo elétrico dependem, sobretudo, da duração do pulso elétrico aplicado em comparação com o tempo de carregamento da membrana. Dessa forma, pode-se definir os pulsos aplicados como longos, curtos e ultra-curtos. Um pulso longo é aquele com várias centenas de nanossegundos, podendo chegar a microssegundos ou até mesmo milissegundos de duração, o que supera o tempo de carregamento da membrana plasmática. Um pulso curto é aquele com dezenas de nanossegundos até aproximadamente 100 ns, que em algumas células é inferior ao tempo de carregamento da membrana plasmática. Já um pulso ultra-curto é aquele abaixo de 10 ns, inferior ao tempo de carregamento da maior parte das membranas plasmáticas, porém superior ao tempo de carregamento de algumas organelas celulares, ou próximo a esses valores (MERLA *et al.*, 2012).

Quando pulsos longos são aplicados, tem-se a eletroporação clássica. Por sua vez, os pulsos curtos fazem parte da nanoeletroporação, e deslocam as interações célula-campo elétrico da membrana plasmática para as estruturas intracelulares. Esses efeitos intracelulares são similares aos que ocorrem na membrana plasmática, e envolvem também efeitos secundários.

Dentre os efeitos observados, estão a liberação de cálcio intracelular, a externalização de fosfatidilserina, a ativação de caspase e o surgimento de apoptose (morte celular programada) ou necrose, sendo que os primeiros três fenômenos podem ser entendidos como indicativos de apoptose. De fato, durante a fase inicial da apoptose na membrana plasmática, há moléculas de fosfatidilserina na sua superfície. O aumento do cálcio intracelular armazenado em compartimentos do retículo endoplasmático e mitocôndrias também é um sinalizador da ocorrência de apoptose (VERNIER *et al.*, 2003; BEEBE *et al.*, 2002; BUESCHER *et al.*, 2004; VERNIER *et al.*, 2004).

Através do processo de apoptose, é possível eliminar eficientemente determinados tecidos que perderam a sua funcionalidade ou oferecem algum risco. A célula morre após um estímulo que induz apoptose, porém, ao contrário da necrose, na apoptose não há ocorrência de inflamação ou danos para as células saudáveis circundantes, sendo uma opção na destruição de células cancerígenas.

As configurações do campo elétrico aplicado para induzir apoptose variam. A morte celular apoptótica de células Jurkat⁴ humanas, por exemplo, tem sido obtida com pulsos de 10 ns e 300 kV/cm. Já a externalização de fosfatidilserina foi observada com pulsos mais longos e campo elétrico inferior, em torno de 30 ns e 50 kV/cm, que também pode ser considerado como um estímulo apoptótico.

Observa-se que os pulsos elétricos utilizados na apoptose são de amplitude relativamente elevada e curta duração. Isso faz com que o potencial transmembrana atinja valores superiores a 1 V e a formação de poros predomine ao longo das membranas internas. Exemplos de membranas internas que podem ser eletroporadas nesta condição são as especializadas no armazenamento de cálcio (Ca^{2+}), tais como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, ocasionando a liberação de Ca^{2+} no citosol. Além deste efeito fisiológico direto nas membranas, os intensos campos elétricos também afetam os canais dependentes de tensão e outras estruturas proteicas.

De forma geral, pode-se dizer que os efeitos primários estão relacionados às mudanças estruturais da membrana celular e podem ocorrer ambos com aplicações de pulsos longos ou curtos, enquanto que os efeitos secundários representam mudanças nas funções celulares em resposta a pulsos curtos.

⁴ Jurkat: tipo de células da linhagem dos linfócitos T derivadas a partir da leucemia de células T humanas e utilizadas na determinação do mecanismo de suscetibilidade diferencial a drogas anticancerígenas e radiação.

Porém, uma vez que esses efeitos são específicos da célula, cada tipo reage de forma distinta a um dado pulso. No caso dos pulsos ultracurtos, seus efeitos vão além da desestabilização da membrana e ainda não são conhecidos. Nesse trabalho, não será abordada a faixa de duração dos pulsos ultracurtos que são inferiores a 1 ns.

2.6 APLICAÇÕES DA ELETROPORAÇÃO E NANOELETROPORAÇÃO

A aplicação da eletroporação na entrega de moléculas impermeáveis foi introduzida por Neuman e Rosenheck, em 1972. Atualmente, encontra inúmeras aplicações, como em clínicas para tratamento de câncer, no método denominado eletroquimioterapia, em que drogas intratumorais são injetadas e posteriormente pulsos elétricos são aplicados no local (NEUMAN e ROSENHECK, 1972; GOTHELF *et al*, 2003).

Na eletroquimioterapia, a ação de drogas como a bleomicina e a cisplatina é potencializada através do rompimento da membrana e aumento na quantidade de drogas entregues ao meio intracelular, melhorando a absorção e otimizando o processo de morte das células tumorais (KOTNIK *et al*, 2012). Apesar dessa técnica ainda ser aplicada somente em animais, vários estudos tem demonstrado a eficiência dessa técnica na redução de tumores, desde que a duração e a amplitude do campo elétrico sejam adequadas.

A entrega transdérmica de drogas através do estrato córneo⁵ é outro exemplo de utilização da abertura de poros temporária nas bicamadas lipídicas para a introdução de determinadas substâncias. Este método é considerado menos agressivo do que a aplicação de injeções, já que não necessita de agulhas (dependendo do tipo de eletrodo) e pode evitar problemas de absorção inadequada ou degradação da medicação oral no sistema digestivo.

Outra importante aplicação da eletroporação é a técnica de transferência gênica por eletroporação (eletrotransfecção), que pode auxiliar no tratamento de doenças genéticas a partir da substituição de genes defeituosos. De modo geral, um processo básico de eletrotransfecção consiste de um campo elétrico aplicado provocando eletroporabilidade da membrana plasmática, mas também

⁵ Extrato córneo: camada mais externa da pele formada por queratina.

impulsionando o DNA a ter contato com a superfície celular, através das forças eletrostáticas (eletroforese), formando um complexo metaestável entre o plasmídeo e a região eletropermeabilizada da membrana. Após um tempo o DNA deixa o complexo e se difunde no citoplasma, sendo que uma pequena fração atravessa a membrana nuclear de forma a ser expressa geneticamente (ESCOFFRE *et al.* 2010; PAGANIN-GIOANNI *et al.* 2011).

Este processo envolve a ultrapassagem de duas barreiras em nível celular, tanto em técnicas virais, químicas ou físicas, que são a membrana plasmática e a nuclear. Estudos têm indicado que a eficiência do processo aumenta quando o envelope nuclear é rompido, a partir da aplicação de pulsos específicos (GOLZIO *et al.*, 2002; ESCOFFRE *et al.*, 2010).

Alguns estudos, como os de DENG *et al.* (2003) e SCHOEMBACH *et al.* (2001), introduziram a ideia de pulsos de curta duração na eletroporação a fim de perturbar a membrana das organelas sob alta tensão e otimizar a transferência gênica. De modo similar, BEEB *et al.* (2003, 2004), descreveu um estudo onde houve um aumento de 3,6 vezes na expressão dos genes, verificados através da intensidade da fluorescência verde GFP, em comparação com a eletroporação convencional.

Além dessas aplicações, a eletroporação irreversível também é utilizada na indústria para a eliminação de microorganismos em medicamentos ou alimentos, aumento a sua durabilidade e mantendo as suas propriedades (SALDAÑA *et al.*, 2014). A aplicação de pulsos de nanossegundos também vem ganhando notoriedade com base em resultados que demonstram a ação de hormônios sintéticos em tecidos celulares (KOTNIK *et al.*, 2015).

2.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DA ELETROPORAÇÃO

Diversos modelos matemáticos vêm sendo desenvolvidos para descrever equacionalmente as alterações na membrana celular na presença de um campo elétrico externo. A importância da modelagem matemática neste campo é dada pela possibilidade de não somente compreender este fenômeno microscópico, mas também de expandir as pesquisas na área sem custos excessivos com experimentos.

Como exemplos de modelos, tem-se o desenvolvido por RAMOS (2005), a fim de analisar a variação temporal da condutividade da

membrana, sobretudo nos momentos iniciais do surgimento dos poros. Outro modelo foi desenvolvido por MIKLAVCIC e TOWHIDI (2010), abordando a estrutura da membrana e as mudanças na condutividade, através de um processo que pode ser dividido em quatro etapas. Inicialmente, na primeira etapa, os lipídeos estão fechados e intactos, fazendo com que a estrutura da membrana apresente uma baixa permeabilidade. Com a aplicação de um campo elétrico, tem-se a segunda etapa caracterizada pela inclinação dos grupos lipídicos. Na terceira etapa tem-se a formação dos pré-poros, e posteriormente na quarta e última etapa ocorre a definição se os poros abertos serão reversíveis ou irreversíveis, de acordo com a intensidade do campo elétrico aplicado. As mudanças estruturais e de condutividade da célula são modeladas com base no esquema de cinética química e no modelo barreira de trapézio, resultando em um modelo de transporte molecular a partir do qual foi investigada a eficiência da eletroporação de acordo com diferentes formas de pulsos aplicados (KAKORIN e NEUMANN, 2002).

Por sua vez, MOVAHED *et al.* (2014) realizou um estudo sobre a eletroporação de uma célula isolada em um microcanal, modelando matematicamente o processo a fim de identificar as áreas em que predomina a formação de nanoporos. Os resultados numéricos obtidos demonstraram a relação entre a frequência e a taxa de geração dos nanoporos, assim como a dependência entre a variação do tempo e a forma e o número dos nanoporos criados.

Além desses modelos, a dinâmica do processo de eletroporação pode ser estudada pelo modelo assintótico da eletroporação, o qual é uma versão simplificada das equações diferenciais parciais de Smoluchowski, e foi desenvolvido por NEU e KRASSOWSKA (1999). De acordo com a simplificação, o modelo pode ser descrito por uma equação diferencial ordinária, de menor custo computacional. A descrição completa do modelo assintótico utilizado neste trabalho encontra-se na seção de Metodologia.

3 METODOLOGIA

Nesta sessão, inicialmente será apresentado o modelo matemático da eletroporação utilizado para obter o potencial transmembrana, a densidade de poros e a condutividade elétrica nas membranas durante a aplicação dos pulsos elétricos. Logo após, tem-se a geometria celular que será empregada neste estudo, expressa em uma dimensão 2D axi-simétrica. Na sequência, tem-se a descrição dos procedimentos realizados neste trabalho, compostos de 4 etapas, em que a etapa inicial contém os dados utilizados na configuração de cada parâmetro que compõe o modelo e a geometria celular, e as demais etapas são os estudos realizados.

3.1 DESCRIÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO DA ELETROPORAÇÃO

O processo de eletroporação nas membranas plasmática e nuclear foi estudado com base nas variações de potencial transmembrana, densidade de poros e condutividade elétrica. O potencial transmembrana induzido pela aplicação de um campo elétrico em células esféricas intactas pode ser modelado com base na equação de Laplace no domínio do tempo, válida para uma forma dielétrica fina imersa em um meio condutivo. Na membrana plasmática, V_m é dado por (SUZUKI *et al.*, 2011):

$$V_m = 1,5 \cdot E_0 \cdot R_c \cdot \cos\theta \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{mp}}} \right) \quad (5)$$

onde 1,5 é um fator que reflete as propriedades elétricas e geométricas da célula quando se assume que a condutividade da membrana é muito menor do que as condutividades do citoplasma e solução aquosa, além disso, a célula é considerada aproximadamente esférica. O termo E_0 é a intensidade do campo elétrico, R_c é o raio celular, θ é o ângulo formado entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor normal à superfície da membrana, τ_{mp} é o tempo de carregamento da membrana plasmática e t é o tempo de exposição da membrana ao campo elétrico aplicado.

Em termos de funções de transferência, V_m pode ser descrito por (FOSTER, 2000):

$$V_m(s) \approx \frac{1,5R_c}{1 + s \tau_{mp}} E_0(s) \quad (6)$$

No caso da membrana nuclear, a função de transferência que descreve o potencial transmembrana V_{mn} nesta região é dada por (FOSTER, 2000):

$$V_{mn}(s) \approx \frac{1,5 R_n}{1 + s \tau_{mn}} E_{cit}(s) \quad (7)$$

onde R_n é o raio nuclear, τ_{mn} é o tempo de carregamento da membrana nuclear e E_{cit} é a intensidade do campo elétrico no citoplasma, que por sua vez é obtido por (FOSTER, 2000):

$$E_{cit}(s) = \frac{s \tau_{mp}}{1 + s \tau_{mp}} E_0(s) \quad (8)$$

No domínio do tempo, uma aproximação para V_{mn} foi estimada em (YAO *et al.*, 2009) como:

$$V_{mn} \approx \frac{1,5 \cdot \tau_{mp} \cdot R_n \cdot E_0}{\tau_{mp} - \tau_{mn}} \left(e^{-\frac{t}{\tau_{mp}}} - e^{-\frac{t}{\tau_{mn}}} \right) \cos\theta \quad (9)$$

No entanto, alguns autores como SCHOENBACH *et al.* (2001) consideram que V_{mn} também poderia ser obtida a partir da Equação 5, uma vez que a condutividade da membrana nuclear é significativamente menor do que as condutividades do citoplasma e plasma nuclear. Do mesmo modo, neste caso os parâmetros E_0 , θ e t seguem o mesmo princípio da membrana plasmática. Porém, R_c é substituído pelo raio do núcleo R_n e τ_{mp} é substituído pelo tempo de carregamento da membrana nuclear τ_{mn} .

A densidade de poros e a condutividade elétrica são obtidas a partir de um modelo matemático não-linear, resultante da simplificação da equação diferencial parcial de Smoluchowski (SMITH e WEAVER, 2008), a fim de reduzir os custos computacionais. A equação original descreve a formação e expansão dos poros com diferentes raios durante a eletroporação, enquanto que o modelo resultante considera apenas a formação e é caracterizado como uma equação diferencial ordinária, podendo ser empregado quando o sistema recebe pulsos de corrente alternada (AC) ou de corrente contínua (DC) de curta duração

(microssegundos ou nanossegundos) e alta intensidade (quilovolts/cm).

As simplificações do modelo são feitas considerando-se que nessas condições os poros não se expandem significativamente após a sua criação. Os resultados obtidos em VASILKOSKI *et al.* (2006) e JOSHI *et al.* (2004), usando a equação de Smoluchowski, demonstraram esse fato, pois os poros foram criados com tamanho mínimo de $0,8 \text{ nm}$ (VASILKOSKI *et al.*, 2006) e $0,7 \text{ nm}$ (JOSHI *et al.*, 2004) e expandiram-se lentamente até $0,83 \text{ nm}$ (VASILKOSKI *et al.*, 2006) e $0,75 \text{ nm}$ (JOSHI *et al.*, 2004), equilibrando-se e assim permanecendo até a fase de fechamento.

Uma possível explicação para esse fenômeno é que quando a tensão transmembrana se eleva significativamente, a criação e a expansão dos poros contribuem para aumentar a condutância da membrana e, conseqüentemente, manter a tensão transmembrana associada em torno de 1 V ou menos. Assim, a criação dos poros é muito mais significativa do que a expansão dos mesmos. A inclusão da expansão dos poros é importante em modelos que envolvem dinâmica molecular, os quais dependem fortemente da distribuição do tamanho dos poros.

Embora o comportamento detalhado de um conjunto de poros seja uma função do campo aplicado, as previsões fornecidas por este modelo matemático são robustas. Ou seja, se a criação de poros sobrepõe a expansão num dado momento, haverá a indicação de um estado em que a tensão transmembrana cai de um pico transitório superior a 1 V para valores inferiores a 1 V como consequência do rompimento dielétrico reversível da membrana.

Dessa forma, segundo o modelo assintótico da eletroporação, a densidade de poros $N(t) = \int_{r^*}^{\infty} n(r, t) dr$, em que r^* é o raio inicial do poro hidrofílico, é dada a partir da taxa de criação de poros $dN(t)/dt$ (SMITH e WEAVER, 2008):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha e^{\left(\frac{V_m(t)}{V_{ep}}\right)^2} \left(1 - \frac{N(t)}{N_0} e^{-q\left(\frac{V_m(t)}{V_{ep}}\right)^2}\right) \quad (10)$$

onde $V_m(t)$ é o potencial transmembrana, V_{ep} é a tensão característica da eletroporação, N_0 é a densidade de poros de equilíbrio a $V_m = 0$, α é o coeficiente da taxa de criação de poros e q é um coeficiente da eletroporação.

Por sua vez, a condutividade média da membrana nas regiões onde os poros são formados é (SMITH e WEAVER, 2008):

$$\sigma_m(t) = \sigma_{m_0} + N(t)\sigma_p\pi r_p^2 K \quad (11)$$

onde σ_{m_0} é a condutividade da membrana antes da eletroporação, σ_p é a condutividade do meio dentro do poro e r_p é o raio do poro. O termo K é um coeficiente particionado dependente da tensão transmembrana, dado por (SMITH e WEAVER, 2008):

$$K = \frac{e^{v_m} - 1}{\frac{w_0 e^{w_0 - \eta v_m}}{w_0 - \eta v_m} e^{v_m} - \frac{w_0 e^{w_0 + \eta v_m} + \eta v_m}{w_0 + \eta v_m}} \quad (12)$$

onde w_0 é a barreira de energia dentro do poro, η é a profundidade relativa dos poros na membrana e $v_m = \frac{q_e}{kT} V_m$ é o potencial transmembrana adimensional.

Alguns autores utilizam um σ_p único para todas as membranas celulares, enquanto que outros descrevem a condutividade do poro na membrana plasmática como sendo (REMS *et al.*, 2013):

$$\sigma_{p_{mp}} = \frac{\sigma_e - \sigma_{cit}}{\ln\left(\frac{\sigma_e}{\sigma_{cit}}\right)} \quad (13)$$

Enquanto que a condutividade do poro na membrana nuclear é dada por (REMS *et al.*, 2013):

$$\sigma_{p_{mn}} = \frac{\sigma_{cit} - \sigma_{np}}{\ln\left(\frac{\sigma_{cit}}{\sigma_{np}}\right)} \quad (14)$$

3.2 DEFINIÇÃO DA GEOMETRIA CELULAR

O estudo da formação de poros nas membranas plasmática e nuclear assumiu uma geometria celular conforme o diagrama esquemático da Figura 4, disposto em um eixo 2D-axisimétrico, considerando-se apenas a célula e o núcleo. As demais organelas, apesar de também sofrerem alterações durante a eletroporação, foram desconsideradas por não ser objeto desse estudo, cujo foco principal está nos processos que envolvem um caminho para moléculas desde o meio externo até o núcleo.

envolvidos no processo de modelagem variam de acordo com cada estudo e serão descritos posteriormente.

Os estudos no domínio do tempo utilizando este sistema foram implementados utilizando o software COMSOL *Multiphysics*®, versão 5.1, e importados para o Matlab® a fim de serem manipulados graficamente.

3.3 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS

Inicialmente, o modelo matemático da eletroporação implementado no COMSOL foi validado, tanto na implementação geométrica do modelo celular quanto do modelo da eletroporação. Uma forma de validação consistiu em aplicar a mesma configuração do artigo de RETELJ *et al.* (2013) num sistema celular no COMSOL e comparar os dados obtidos com os do artigo. A outra forma consiste em uma validação analítica, através do MATLAB, na qual é verificado o potencial transmembrana obtido tanto no COMSOL quanto no MATLAB utilizando-se equações aproximadas de V_m .

Após a validação, foi feita a escolha do ponto celular onde os efeitos serão observados, uma vez que a análise é feita no domínio do tempo. Para isso, fez-se o acompanhamento do potencial transmembrana com ângulos variando entre 0 e 90 graus, e verificou-se onde esse potencial era mais elevado.

Na sequência, iniciam-se os estudos, divididos em 4 etapas. Uma visão geral dos procedimentos metodológicos propostos para cada etapa encontra-se na Figura 5. Em síntese, na Etapa 1 serão definidos os parâmetros que não se alteram ao longo do estudo, como os do modelo matemático da eletroporação, além do conjunto de parâmetros geométricos inerentes a determinadas células. Na Etapa 2, é feito um estudo da influência dos parâmetros do pulso elétrico, logo, a condutividade da solução externa e o tempo de carregamento (que corresponde a uma dada célula) são mantidos fixos, enquanto que os parâmetros duração e amplitude são variados e seus efeitos analisados. Na Etapa 3, na qual é realizado um estudo da condutividade da solução externa, este parâmetro é variado, enquanto que o pulso elétrico mantém a sua duração e amplitude, assim como a célula em análise permanece a mesma, implicando num mesmo tempo de carregamento. Por fim, na Etapa 4 é feito um estudo sobre a influência do tempo de carregamento e

dos parâmetros que o compõe, variando-o para um mesmo pulso elétrico e configuração de condutividade externa.

3.3.1 Etapa 1: Definição dos parâmetros iniciais

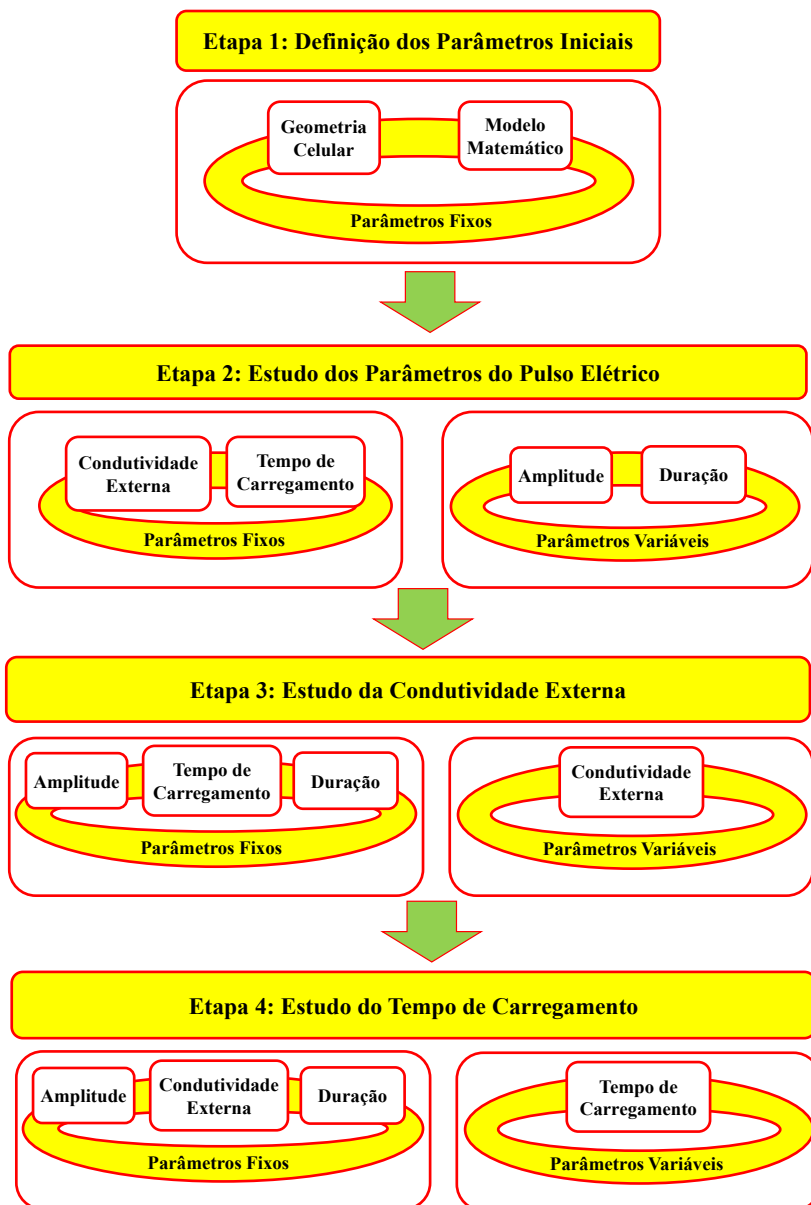
Nesta etapa foram definidos os valores que compõem a configuração inicial dos parâmetros da geometria celular e do modelo matemático da eletroporação. Para tanto, foi realizada uma revisão bibliográfica envolvendo as bases de dados IEEE Xplore, SpringerLink Science Direct e Google Acadêmico, restrito ao período entre 1980-2015, englobando a década na qual os modelos matemáticos começaram a considerar a formação de poros até o ano em que foi realizada a etapa da pesquisa.

Durante a busca, foram utilizadas as seguintes palavras chave com operadores booleanos: "*nanosecond electric pulse*" OR "*high-intensity electric pulse*" OR "*model of electroporation*". Diversos resultados foram encontrados, sendo inclusos somente os artigos científicos, aceitos para publicação ou publicados online, escritos em inglês. Excluíram-se livros, resumos e trabalhos de congressos. Após a busca geral, cada um dos artigos encontrados foi organizado numa classificação referente a geometria celular ou ao modelo matemático.

Os artigos contendo as características celulares foram analisados a fim de se verificar se continham todas as especificações de raios, espessuras, condutividades, permissividades, capacitâncias e condutâncias para toda a estrutura de um mesmo tipo de célula biológica, sendo selecionados somente os que atendiam essa condição e excluídos os demais. Apesar de nem todos esses parâmetros serem requisitos mínimos a serem inseridos no modelo da eletroporação e geometria celular, eles são necessários para o cálculo do tempo de carregamento das membranas, que será abordado na Etapa 4.

Figura 5 - Etapas dos procedimentos empregados. Etapa 1: Definição dos parâmetros iniciais – nesta etapa, são buscados os dados para configurar tanto a geometria celular quanto o modelo matemático. Etapa 2: Estudo dos parâmetros do pulso elétrico – nesta etapa, o tempo de carregamento e a condutividade externa são mantidos fixos, enquanto que os parâmetros amplitude e duração do pulso elétrico são variáveis. Etapa 3: Estudo da condutividade externa – nesta etapa, os parâmetros duração e amplitude do pulso são fixados, assim como o tempo de carregamento das membranas, enquanto varia-se a condutividade externa. Etapa 4: Estudo do tempo de carregamento – nesta etapa são fixados os

parâmetros duração e amplitude do pulso elétrico, assim como condutividade externa, sendo apenas variado o tempo de carregamento das membranas.



Fonte: Próprio autor.

A condutividade do meio extracelular, embora seja indispensável para o cálculo do tempo de carregamento e configuração do modelo e geometria, não é um fator preponderante para a escolha do conjunto de parâmetros, uma vez que pode ser manipulada em laboratório e adotar diferentes valores.

Após a seleção dos artigos referentes às características celulares, um processo semelhante de escolha foi aplicado para selecionar os que continham parâmetros do modelo assintótico da eletroporação. Optou-se por artigos com dados completos referentes ao modelo, ou que apresentassem equações e relações para obter os parâmetros que não eram explicitados diretamente.

Os dados celulares obtidos encontram-se nos ANEXOS A, B, C e D, contendo capacitâncias, condutâncias, permissividades e condutividades para as membranas plasmática e nuclear, assim como para o citoplasma e nucleoplasma. Além disso, tem-se as espessuras de ambas as membranas, e os raios das células e dos seus respectivos núcleos. Ao final de cada tabela que compõe os anexos, estão indicados os valores mínimos, máximos e padrões (ou médios) para aquele determinado parâmetro, descrito com base nos dados adquiridos.

Ao longo da busca, observou-se que ao se ter priorizado artigos com dados celulares que abrangessem as características da célula como um todo, a fim de ser calculado o tempo de carregamento e também descrever o sistema celular com mais fidelidade, as variações mínimas e máximas obtidas com base nesses dados apresentam certa limitação em relação a realidade das células biológicas de forma mais ampla. Um exemplo é o próprio intervalo de tamanhos de raios celulares, que segundo a busca, restringiu-se a no máximo $11\ \mu m$, sendo que existem células de até $100\ \mu m$ de raio. Para fins informativos, tem-se no ANEXO F uma relação das variações desses parâmetros e os valores mais comumente utilizados nos estudos da área. Outro fato que pode ser observado, é que as células teóricas utilizadas na maioria dos trabalhos que envolvem modelagem matemática na área, não refletem a realidade das células reais.

No ANEXO G, a tabela expõe a lista de valores para os parâmetros do modelo matemático da eletroporação, encontrados nos artigos que foram selecionados nesta revisão sistemática. São definidos valores para:

- a constante da eletroporação q ;
- o parâmetro da eletroporação α ;

- densidade de poros de equilíbrio N_0 ;
- tensão característica da eletroporação V_{ep} ;
- barreira de energia no poro w_0 ;
- profundidade relativa dos poros η ;
- raio dos poros r_p ;
- temperatura absoluta T ;
- condutividade da solução aquosa dentro do poro σ_p .

Ao final da tabela, definiram-se os valores mínimos, máximos e padrões para esses dados. Os valores padrões que foram escolhidos para configurar o modelo ao longo de todos os estudos encontram-se na Tabela 1, juntamente com a constante de Boltzmann k e a carga do elétron q_e , utilizados no modelo e com valores padronizados.

Os dados selecionados para configurar o sistema celular variam de acordo com cada estudo, e são descritos nas sessões posteriores da Metodologia ou dos Resultados.

3.3.2 Etapa 2: Estudo dos parâmetros do pulso elétrico

O primeiro estudo realizado está relacionado com a escolha dos parâmetros do pulso elétrico empregado na aplicação de um determinado campo elétrico num sistema celular. A configuração do pulso pode ser determinante para definir o nível de alteração da permeabilidade celular.

Dentre os aspectos que influenciam a eficiência do processo de eletroporação estão o tempo no qual a amplitude do pulso excede o limiar para início da abertura de poros e o seu formato. O formato de um pulso elétrico é determinado de acordo com seu tempo de subida e descida (pulso quadrático, triangular ou de Gauss) ou com a polaridade do campo elétrico (pulso unipolar ou bipolar), além da sua duração.

Além disso, cada formato de pulso no domínio do tempo tem um perfil espectral diferente que representa a distribuição de energia em frequência. Uma vez que as propriedades elétricas da célula dependem da frequência, a resposta para cada pulso é fortemente dependente tanto da forma do perfil temporal do pulso quanto do seu espectro.

Tabela 1 - Parâmetros Seleccionados Para Configurar o Modelo Matemático da Eletroporação.

Parâmetro	Símbolo	Valor Seleccionado	Unidade
Constante da eletroporação ^{3,4,5,6,8,10}	q	2,46	-
Taxa de criação dos poros ^{1,2,3,4,5,6,9,10,11,12,13}	α	10^9	$m^2 s^{-1}$
Densidade de poros de equilíbrio ^{3,4,5,6,8,10,12,14}	N_0	$1,5 \times 10^9$	m^{-2}
Tensão característica da eletroporação ^{4,5,6,8,10,11,12,13}	V_{ep}	258	mV
Barreira de energia dos poros ^{3,4,5,8,10}	w_0	2,65	-
Profundidade relativa dos poros ^{1,2,3,4,5,7,8,9,10}	η	0,15	-
Raio dos poros ^{1,2,3,7,9,14}	r_p	0,8	nm
Temperatura absoluta ^{2,8,9,10,13}	T	300	K
Condutividade da solução aquosa nos poros ^{1,4,7,9}	σ_p	1,2	S/m
Constante de Boltzmann	k	$1,38 \times 10^{-23}$	$m^2 kgs^{-2} K^{-1}$
Carga do elétron	q_e	$1,602 \times 10^{-19}$	C

Fontes: ¹SALIMI *et al.*, 2013; ²SMITH e WEAVER, 2008; ³PUCIHAR *et al.*, 2009; ⁴TALELE *et al.*, 2010; ⁵RETELJ *et al.*, 2013; ⁶REMS *et al.*, 2013; ⁷GOWRISHANKAR *et al.*, 2006; ⁸DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999; ⁹SMITH *et al.*, 2006; ¹⁰STEWART *et al.*, 2004; ¹¹MOVAHED *et al.*, 2014; ¹²YANG *et al.*, 2010; ¹³MOVAHED e LI, 2013; ¹⁴CHIEA *et al.*, 2012.

Quando a energia está concentrada nas altas frequências, a célula é vista de forma transparente pelo pulso elétrico. Por outro lado, quando a concentração de energia está nas frequências mais baixas, a membrana plasmática tende a atuar como uma camada protetora do interior da célula.

Apesar da maioria dos estudos de eletroporação considerar a aplicação de um trem de pulsos, alguns trabalhos científicos mostraram que um único pulso de duração e intensidade adequada é suficiente para proporcionar a mesma eficiência dos efeitos nas membranas celulares (FREY *et al.*, 2006; PAKHOMOV *et al.*, 2007; TEKLE *et al.*, 2005). Segundo os autores, vários pulsos de baixa intensidade (centenas de volts por centímetro) se equiparam a um único pulso de maior intensidade (alguns quilovolts por centímetro).

Cada aplicação biológica requer diferentes parâmetros do pulso elétrico, de acordo com a necessidade de afetar as estruturas e os processos intracelulares ou a membrana plasmática, de forma reversível ou irreversível. A fim de atender essa demanda, existem dispositivos que geram pulsos com diferentes larguras e amplitudes. Por exemplo, alguns dispositivos podem ser configurados para larguras de pulso entre 10 ns e 1.000 ns, e amplitudes de até 10 kV, enquanto que outros ficam na faixa entre 1 ms e 10.000 ms, com amplitudes entre 100 V e 300 V.

Quanto maior o número possível de parâmetros, maior a gama de aplicações possíveis de ser realizada com um determinado eletroporador. Além disso, para um melhor controle do processo, é preferível o uso de geradores de pulsos quadráticos em detrimento daqueles com queda exponencial (REBERŠEK e MIKLAVČIČ, 2011).

Um desafio para eletroporadores com pulsos quadráticos é controlar a rampa de subida e descida, para que seja a menor possível. Geralmente este inconveniente é amenizado com o aumento da capacidade da bateria de condensadores usada para o armazenamento da energia. Por esse motivo, alguns dispositivos dividem a gama de operações em níveis, tais como baixa tensão e pulso longo ou alta tensão e pulsos curtos. Com isso reduz-se a quantidade necessária de energia a ser armazenada (REBERŠEK e MIKLAVČIČ, 2011).

Neste estudo, definiu-se a utilização de pulsos elétricos quadráticos, logo, têm-se como parâmetros de controle principalmente a amplitude e a duração, além dos tempos de subida e descida do pulso.

A fim de verificar os efeitos nas membranas plasmática e nuclear quando submetidas a diferentes configurações de campo elétrico, foram feitos diversos testes com pulsos classificados como curtos, médios e longos, combinados a amplitudes classificadas como baixas, médias e altas, conforme Tabela 2. Os tempos de subida e descida foram definidos como sendo 1% da duração do pulso.

Tabela 2 - Configurações do pulso elétrico.

Campo Elétrico	Duração	Característica
$1kV/cm$	$1\mu s$	Longa duração e baixa amplitude
$2kV/cm$	$100ns$	Média duração e média amplitude
$12kV/cm$	$9ns$	Curta duração e alta amplitude

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 - Parâmetros geométricos empregados para o estudo da influência da duração e amplitude do pulso elétrico, correspondentes às células B16-F1. A condutividade celular foi fixada em $\sigma_e = 0,1 S/m$.

Parâmetro	Símbolo	Valor	Unidade
Raio celular	R_C	$11,4 \times 10^{-6}$	m
Raio nuclear	R_n	$7,3 \times 10^{-6}$	m
Espessura da membrana plasmática	d_{mp}	5×10^{-9}	m
Espessura da membrana nuclear	d_{mn}	10×10^{-9}	m
Condutividade do citoplasma	σ_{cit}	0,25	S/m
Condutividade do nucleoplasma	σ_{np}	0,5	S/m
Condutividade inicial da membrana plasmática	σ_{mp_0}	$0,5 \times 10^{-6}$	S/m
Condutividade inicial da membrana nuclear	σ_{mn_0}	100×10^{-6}	S/m
Permissividade do citoplasma	ε_{cit}	70	—
Permissividade do nucleoplasma	ε_{np}	70	—
Permissividade da membrana plasmática	ε_{mp}	4,5	—
Permissividade da membrana nuclear	ε_{mn}	7	—

Fonte: REMS *et al.* (2013).

Na sequência, buscou-se construir um mapa da nanoeletroporação, a partir do estudo de diferentes intensidades de campo elétrico combinadas com diferentes durações de pulso, conforme Tabela 5. Os valores estudados foram escolhidos com intuito de abranger a região

onde os efeitos predominam no interior da célula, neste caso, Células B Normais, descritos na Tabela 4 (JOSHI *et al.*, 2004).

A aplicação de cada pulso implica numa determinada razão Nt_{mn}/Nt_{mp} , compondo diferentes níveis da nanoeletroporação, como será visto na seção de Resultados.

Cada uma das configurações, quando aplicada na geometria previamente definida, foi analisada através do modelo matemático da eletroporação, segundo o potencial transmembrana, a condutividade elétrica e a densidade de poros. Os parâmetros do modelo foram definidos segundo a Tabela 1, enquanto que os da célula foram correspondentes as do tipo B16-F1, descritos na Tabela 3 (REMS *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Parâmetros geométricos empregados na construção do mapa da nanoeletroporação, correspondentes às células B Normais. A condutividade celular foi fixada em $\sigma_e = 0,1 \text{ S/m}$.

Parâmetro	Símbolo	Valor	Unidade
Raio celular	R_C	$3,3 \times 10^{-6}$	m
Raio nuclear	R_n	$2,8 \times 10^{-6}$	m
Espessura da membrana plasmática	d_{mp}	7×10^{-9}	m
Espessura da membrana nuclear	d_{mn}	40×10^{-9}	m
Condutividade do citoplasma	σ_{cit}	1,31	S/m
Condutividade do nucleoplasma	σ_{np}	2,04	S/m
Condutividade inicial da membrana plasmática	σ_{mp0}	56×10^{-6}	S/m
Condutividade inicial da membrana nuclear	σ_{mn0}	$11,1 \times 10^{-3}$	S/m
Permissividade do citoplasma	ϵ_{cit}	60	—
Permissividade do nucleoplasma	ϵ_{np}	120	—
Permissividade da membrana plasmática	ϵ_{mp}	12,8	—
Permissividade da membrana nuclear	ϵ_{mn}	106	—

Fonte: JOSHI *et al.* (2004).

Tabela 5 – Valores de configuração do pulso elétrico empregados na construção do mapa da nanoeletroporação.

Pulso	Campo Elétrico	Duração
Pulso 1	1 <i>kV/cm</i>	10 <i>ns</i>
Pulso 2	1 <i>kV/cm</i>	50 <i>ns</i>
Pulso 3	1 <i>kV/cm</i>	100 <i>ns</i>
Pulso 4	1 <i>kV/cm</i>	200 <i>ns</i>
Pulso 5	1 <i>kV/cm</i>	500 <i>ns</i>
Pulso 6	5 <i>kV/cm</i>	10 <i>ns</i>
Pulso 7	5 <i>kV/cm</i>	50 <i>ns</i>
Pulso 8	5 <i>kV/cm</i>	100 <i>ns</i>
Pulso 9	5 <i>kV/cm</i>	500 <i>ns</i>
Pulso 10	10 <i>kV/cm</i>	10 <i>ns</i>
Pulso 11	10 <i>kV/cm</i>	50 <i>ns</i>
Pulso 12	10 <i>kV/cm</i>	100 <i>ns</i>
Pulso 13	10 <i>kV/cm</i>	500 <i>ns</i>
Pulso 14	12 <i>kV/cm</i>	10 <i>ns</i>
Pulso 15	12 <i>kV/cm</i>	50 <i>ns</i>
Pulso 16	12 <i>kV/cm</i>	100 <i>ns</i>
Pulso 17	12 <i>kV/cm</i>	500 <i>ns</i>

Fonte: Próprio autor.

3.3.3 Etapa 3: Estudo da condutividade externa

Da mesma forma que os parâmetros duração e amplitude do pulso elétrico, a condutividade da solução externa também pode ser manipulada e configurada de acordo com uma dada especificação requerida. Diferentes soluções aquosas são obtidas a partir da alteração

de suas composições e propriedades, tais como a osmolaridade, o pH, as concentrações de cloreto de magnésio (MgCl_2 e) e cloreto de sódio (NaCl), dentre outras.

Algumas soluções já são previamente definidas e apresentam condutividades padronizadas. Alguns exemplos são: PBS (1,436 S/m), SMEM (1,413 S/m), NTN (1,421 S/m), NHM (1,450 S/m), NSTM (0,6 S/m), NSHM (0,6 S/m), S5TM (0,375 S/m), S5HM (0,375 S/m), SHM (0,092 S/m), SNM (0,092 S/m), GTM (0,106 S/m), ATM (0,093 S/m) e STM (0,096 S/m) (SILVE *et al.*, 2016). Porém isso não limita a utilização de valores distintos dessas soluções.

Para a realização deste estudo, a condutividade da solução externa foi configurada em 3 valores, sendo um deles abaixo das condutividades do nucleoplasma e citoplasma ($\sigma_1 < \sigma_{cit} < \sigma_{nuc}$), outro entre as condutividades do citoplasma e nucleoplasma ($\sigma_{cit} < \sigma_2 < \sigma_{nuc}$) e por fim um valor de condutividade superior tanto a condutividade do citoplasma quanto a do nucleoplasma ($\sigma_3 > \sigma_{nuc} > \sigma_{cit}$).

A célula analisada teve os parâmetros configurados conforme Tabela 4, com exceção das condutividades do citoplasma e do nucleoplasma que foram modificadas para $\sigma_{cit} = 0,5 S/m$ e $\sigma_{nuc} = 1 S/m$, respectivamente, a fim de que σ_3 não fosse tão elevado. Dessa forma, tem-se os valores de condutividade extracelular empregados no estudo definidos conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Configurações de condutividades extracelular.

Condutividade	Valor da condutividade σ_e	Característica
Condutividade 1	0,1 S/m	$\sigma_1 < \sigma_{cit} < \sigma_{nuc}$
Condutividade 2	0,7 S/m	$\sigma_{cit} < \sigma_2 < \sigma_{nuc}$
Condutividade 3	1,2 S/m	$\sigma_3 > \sigma_{nuc} > \sigma_{cit}$

Fonte: Próprio autor.

Na sequência, os mesmos valores de condutividade extracelular da Tabela 6 foram analisados juntamente com variações de raios celulares e nucleares. Para tanto, foram obtidas as razões entre os valores do raio da célula e do núcleo, para os valores encontrados no ANEXO A, o que resultou na faixa expressa na Tabela 7.

Tabela 7 - Razões entre os raios da célula e do núcleo.

Tipo de célula	Razão R_c/R_n
B Normais	1,1785
B Neoplásicas	1,1818
Magala	1,1856
T Peer	1,1860
BJAB	1,1864
Daudi	1,1867
B Normais	1,1870
T HDMAR	1,1871
Farage	1,1872
Raji	1,1873
T Normais	1,1888
Linfócitos	1,3181
B16-F1	1,5616
Teóricas	3,3333

Fonte: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989; POLEVAYA *et al*, 1999).

Embora a variação da razão R_c/R_n tenha ficado restrita a região entre 1,1 e 3,3, o objetivo é apenas demonstrar a tendência das curvas à medida que os parâmetros de condutividade e razões entre raios são variados, então se considera que essa faixa seja suficiente para cumprir dada finalidade.

3.3.4 Etapa 4: Estudo do tempo de carregamento

A eletroporação ocorre quando o potencial transmembrana atinge uma determinada faixa de tensão, geralmente superior a 200 mV. Uma vez que a membrana apresenta características predominantemente

capacitivas, esse valor de tensão só é atingido após certo tempo de exposição a um dado campo elétrico. Esse tempo varia de acordo com as características celulares e é intrínseco a cada membrana.

A partir de algumas considerações, tais como condutância da membrana plasmática e nuclear aproximadamente iguais a zero, correntes de deslocamento no citoplasma e no eletrólito externo desprezíveis e raio nuclear significativamente menor que o raio celular, têm-se as equações 15 e 16 para os tempos de carregamento referentes a cada membrana (FOSTER e SCHWAN, 1995). Assim, o tempo de carregamento da membrana plasmática é dado por (YAO *et al.*, 2009):

$$\tau_{mp} = R_c \cdot \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{mp}}{d_{mp}} \left(\frac{1}{\sigma_{cit}} + \frac{1}{2\sigma_{sol}} \right) \quad (15)$$

onde R_c é o raio da célula, d_{mp} é a espessura da membrana plasmática, σ_{cit} é a condutividade do citoplasma, σ_{sol} é a condutividade da solução onde a célula é imersa, ε_{mp} é a permissividade da membrana plasmática e ε_0 é a permissividade do vácuo. Em alguns casos, a relação $(\varepsilon_{mp} \cdot \varepsilon_0)/d_{mp}$ é dada diretamente pelo valor da capacitância da membrana plasmática (SUZUKI *et al.*, 2011).

Por sua vez, o tempo de carregamento da membrana nuclear é dado por (YAO *et al.*, 2009):

$$\tau_{mn} = R_{nuc} \cdot \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{mn}}{d_{mn}} \left(\frac{1}{\sigma_{np}} + \frac{1}{2\sigma_{cit}} \right) \quad (16)$$

sendo que R_{nuc} é o raio do núcleo, d_{mn} é a espessura da membrana nuclear, σ_{np} é a condutividade do nucleoplasma e ε_{mn} é a permissividade da membrana nuclear. O termo $(\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{mn})/d_{mn}$ expressa a capacitância da membrana nuclear.

Estudos apontam que o tempo de carregamento da membrana do núcleo seja inferior ao tempo para a célula como um todo. Portanto, é justamente esse aspecto que vai ser analisado nesta etapa, a fim de identificar se realmente existe essa possibilidade, o quanto ela é válida para diversas células e de que forma isso interfere na nanoeletroporação.

O estudo se inicia com a definição da relação entre os elementos que contribuem para que o tempo de carregamento da membrana nuclear τ_{mn} seja menor do que o tempo de carregamento da membrana

plasmática τ_{mp} e a análise da viabilidade dessas relações com base nos dados encontrados através da revisão bibliográfica e contidos nos anexos.

Na sequência, é verificada a influência dos diferentes tempos de carregamento na densidade de poros. Para tanto, utilizou-se o Anexo E, onde estão expressos os tempos de carregamentos calculados tanto para a membrana plasmática quanto para a nuclear dessas células, considerando uma condutividade da solução extracelular como $0,1 S/m$. A última coluna da tabela do ANEXO E expõe a razão entre o tempo de carregamento da membrana plasmática τ_{mp} e o tempo de carregamento da membrana nuclear τ_{mn} .

Dessa forma, cada célula com seu respectivo tempo de carregamento, fornece um ponto para compor um gráfico que demonstra a relação entre esse parâmetro e a densidade de poros para dois tipos de pulso elétrico aplicado. As células utilizadas e seus respectivos tempos de carregamento encontram-se na Tabela 8, enquanto que os dados completos estão descritos nos ANEXOS A, B, C, D e E. Um dos pulsos aplicados foi de $100 ns$ e $5 kV/cm$, enquanto que o outro foi de $10 ns$ e $10 kV/cm$. A escolha da configuração dos pulsos se deu após uma série de pré-testes realizados com diferentes configurações. Assim, optou-se por utilizar um pulso de maior intensidade combinado com menor duração, e outro de menor intensidade e maior duração, a fim de demonstrar os efeitos em cada região da célula.

Tabela 8 – Dados celulares utilizados para o estudo da relação entre o tempo de carregamento e a nanoeletroporação.

Célula	τ_{mp}	τ_{mn}	Razão τ_{mn}/τ_{mp}
Linfócitos	96 ns	86 ns	1,1
Células B16-F1	87 ns	37 ns	2,3
Células Teóricas	59 ns	11 ns	5,1
Células B Normais	267 ns	106 ns	7,8

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989).

Considerando que τ é dependente dos raios, espessuras, condutividades e permissividades, esses parâmetros também foram analisados, relacionados com a densidade de poros nas membranas. O primeiro parâmetro analisado foi o raio, sendo utilizado três tipos de

células, que implicam em três relações R_c/R_n , conforme Tabela 9. Então, aplicando-se um pulso de 12 kV/cm e 9 ns de duração, observou-se Nt_{mp} e Nt_{mn} para cada célula. A escolha dessa configuração de pulso está voltada para o estudo da nanoeletroporação (pulsos curtos e intensos).

Tabela 9 - Dados celulares utilizados para o estudo da relação entre raios celular e nuclear e a nanoeletroporação.

Célula	R_c	R_n	Razão R_c/R_n
Células B Normais	$3,3\mu m$	$2,8\mu m$	1,1
Linfócitos	$2,9\mu m$	$2,2\mu m$	1,3
Células B16-F1	$11,4\mu m$	$7,3\mu m$	1,5

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; ASAMI *et al*, 1989).

Na sequência, foram observados os efeitos na densidade de poros a partir da variação individual do valor de R_c e R_n , conforme Tabela 10. Para o estudo da variação de R_c , variou-se tal parâmetro entre seus valores mínimos e máximos, enquanto mantinha-se $R_n = 2,2\mu m$ (valor mínimo). Do mesmo modo, R_n foi variado entre seus valores mínimos e máximos, mantendo-se $R_c = 11\mu m$ (valor máximo). O pulso aplicado foi de 12 kV/cm e 9 ns de duração. Além das curvas da variação da razão Nt_{mn}/Nt_{mp} à medida que os raios eram aumentados, analisou-se também a relação com os tempos de carregamento de cada membrana.

Tabela 10 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual dos raios celular e nuclear na nanoeletroporação.

	$R_c\text{ (m)}$	$R_n\text{ (m)}$
Valor Mínimo	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$
Valor Máximo	11×10^{-6}	$7,3 \times 10^{-6}$
Valor Médio*/Padrão**	$5,75 \times 10^{-6}$	$4,24 \times 10^{-6}$

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989; POLEVAYA *et al*, 1999).

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de raios.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de espessuras.

Posteriormente, a influência na nanoeletroporação das variações das condutividades do citoplasma e nucleoplasma foram estudadas de forma individual. Para o estudo de ambas as variações, considerou-se a condutividade do eletrólito como $0,1 S/m$ e o pulso elétrico como sendo de $12 kV/cm$ e $9 ns$ de duração. Os valores máximos e mínimos para configurar cada condutividade estão definidos na Tabela 11, sendo que para análise de σ_{np} fixou-se $\sigma_{cit} = 0,25 S/m$ (valor mínimo), enquanto que para análise de σ_{cit} fixou-se $\sigma_{np} = 2,2 S/m$ (valor máximo).

Para melhor análise das curvas, calcularam-se também as relações entre as condutividades que delimitam cada membrana, sendo elas σ_{cit}/σ_e no caso da membrana plasmática e σ_{np}/σ_{cit} para a membrana nuclear. A razão entre essas duas relações também foi obtida, ou seja, $(\sigma_{np}/\sigma_{cit})/(\sigma_{cit}/\sigma_e)$.

Tabela 11 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das condutividades do citoplasma e nucleoplasma na nanoeletroporação.

	$\sigma_{cit} (S/m)$	$\sigma_{np} (S/m)$
Valor Mínimo	0,25	0,5
Valor Máximo	1,31	2,2
Valor Médio *Padrão **	0,72	2,05

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989; POLEVAYA *et al*, 1999).

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de raios.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de espessuras.

Dando continuidade a análise da variação dos parâmetros que compõem a equação simplificada do tempo de carregamento nas membranas plasmática e nuclear, foi verificado como Nt_{mn}/Nt_{mp} se modifica para diferentes espessuras d_{mn} e d_{mp} . Durante as variações de d_{mp} entre seus valores máximos e mínimos, d_{mn} foi fixada em $d_{mn} = 40nm$ (valor padrão). Por sua vez, as variações de d_{mn} entre seus valores máximos e mínimos ocorreu para $d_{mp} = 7nm$ (valor padrão). Esses valores se encontram na Tabela 12, e os estudos foram realizados com a condutividade extracelular fixada em $0,1S/m$, com um pulso de $12 kV/cm$ e $9 ns$ de duração.

Tabela 12 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das espessuras das membranas plasmática e nuclear na nanoeletroporação.

Tipos de Células	$d_c(m)$	$d_n(m)$
Valor Mínimo	5×10^{-9}	10×10^{-9}
Valor Máximo	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Valor Médio */Padrão **	7×10^{-9}	40×10^{-9}

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989; POLEVAYA *et al*, 1999).

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de raios.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de espessuras.

Por fim, foi realizada a análise das permissividades das membranas plasmática ε_{mp} e nuclear ε_{mn} , com a condutividade extracelular fixada em $0,1 S/m$ e pulsos de $12 kV/cm$ e $9 ns$ de duração. As permissividades da membrana plasmática foram variadas entre seus valores mínimo (4,5) e máximo (12,8), mantendo-se $\varepsilon_{mn} = 68,32$ (valor padrão). De forma análoga, as permissividades da membrana nuclear foram analisadas entre seus valores mínimo (7) e máximo (108), para $\varepsilon_{mp} = 8,9$ (valor padrão). Para estes dois casos, foi verificado como Nt_{mn}/Nt_{mp} se modifica ao longo das variações de permissividades, conforme Tabela 13.

As capacitâncias não foram estudadas por serem dependentes das permissividades, segundo a relação $C_m = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_m$, o que indica que terão o mesmo comportamento.

Tabela 13 - Dados celulares utilizados para o estudo da influência da variação individual das permissividades das membranas plasmática e nuclear na nanoeletroporação.

	ε_{mp}	ε_{mn}
Valor Mínimo	4,5	7
Valor Máximo	12,8	108
Valor Médio */Padrão **	8,92	68,32

Fontes: (JOSHI *et al*, 2004; RETELJ *et al*, 2013; REMS *et al*, 2013, ASAMI *et al*, 1989; POLEVAYA *et al*, 1999; HU *et al*., 2005).

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de permissividades das membranas.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de permissividades do citoplasma e nucleoplasma.

4 RESULTADOS

Tendo em vista os procedimentos metodológicos descritos no capítulo anterior, primeiramente foi realizada uma validação analítica da geometria celular, considerando ambas as membranas e utilizando o MATLAB. A validação analítica foi realizada a partir do uso da equação simplificada do potencial transmembrana quando este ainda não superou o limiar da eletroporação, que no caso da membrana plasmática é dada por (YAO *et al.*, 2009):

$$V_{mp} = 1,5E_0R_c\cos\theta \quad (17)$$

onde E_0 é o módulo do campo elétrico, R_c é o raio da célula e θ é o ângulo formado entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor normal à superfície da membrana.

A fim de não desencadear a abertura de poros na membrana plasmática, foi utilizado um campo de baixa intensidade $E_0 = 20 \text{ V/cm}$ para uma célula de $R_c = 10 \mu\text{m}$, e observados os efeitos no potencial transmembrana em relação ao ângulo θ entre 0° e 90° . Na Figura 6 encontra-se a curva de V_m obtida analiticamente no MATLAB, juntamente com a curva resultante no COMSOL após 200 ns de exposição ao campo. Observa-se que os valores máximos de V_m ficam em aproximadamente 35 mV para ambos os casos.

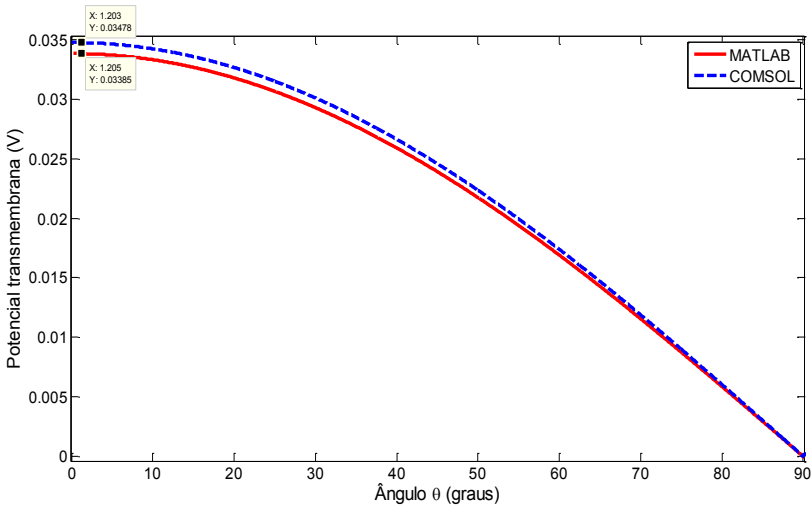
A validação analítica de V_{mn} na membrana nuclear considerou o mesmo campo elétrico e região de análise descritos para a membrana plasmática, e a seguinte equação (YAO *et al.*, 2009):

$$V_{mn} = \frac{1,5E_0R_n t \cos\theta}{\tau_{mn}} \quad (18)$$

onde t é a duração do pulso e τ_{mn} é o tempo de carregamento da membrana nuclear.

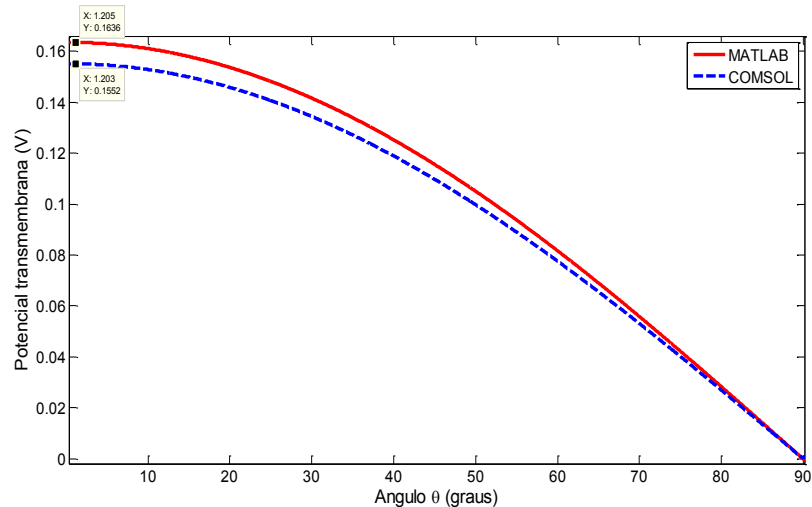
O tempo de carregamento τ_{mn} , segundo as características da célula envolvida, foi calculado pela Equação 16 e obtido um valor aproximado de 11 ns , para um raio nuclear definido como $R_n = 3 \mu\text{m}$. Na Figura 7 estão os resultados obtidos através dos softwares MATLAB e COMSOL, onde se pode identificar um potencial em torno de 160 mV para as membranas nucleares.

Figura 6 - Curvas de V_m na membrana plasmática obtidas no software MATLAB e através do modelo matemático implementado no COMSOL.



Fonte: Próprio autor.

Figura 7 - Curvas de V_m na membrana nuclear obtidas no software MATLAB e através do modelo matemático implementado no COMSOL.



Fonte: Próprio autor.

A fim de tornar a validação mais confiável, calculou-se o erro máximo entre as curvas obtidas analiticamente e aquelas obtidas através do modelo matemático implementado. O cálculo do erro máximo foi feito através da diferença entre as curvas dividida pela curva obtida analiticamente. No caso da membrana plasmática, o erro máximo entre as curvas da Figura 6 foi inferior a 3 %. Para a membrana nuclear na Figura 7, o cálculo apontou um erro máximo de 5 %.

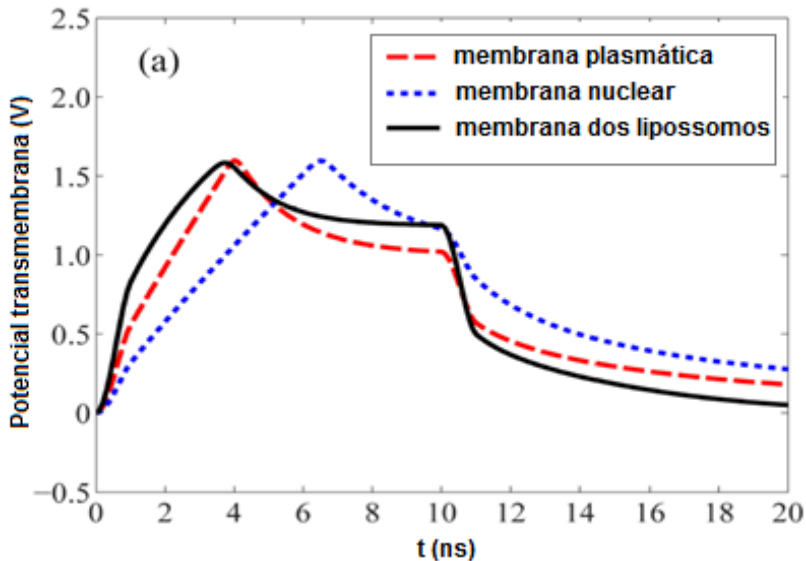
Esta etapa de validação é considerada suficiente para garantir a adequada implementação da geometria celular no software COMSOL. Porém, além da validação analítica da geometria, também foi feita uma validação comparativa do modelo matemático implementado no COMSOL. Para tanto, utilizou-se os dados expostos em RETELJ *et al.* (2013). O conjunto de parâmetros adotado aqui neste estudo e pelo autor do artigo estão expostos no ANEXO H.

As curvas na Figura 7 expressam o resultado do artigo utilizado como base, enquanto que a curva da Figura 8 apresenta o resultado obtido a partir do COMSOL, para a membrana plasmática. A membrana nuclear não foi considerada nesta etapa de validação, pois os autores do artigo consideraram a presença dos lipossomos, já que estes eram o foco do estudo, enquanto que o modelo deste trabalho desconsiderou esses elementos, pois o interesse está apenas na abertura de poros nas membranas plasmática e nuclear. Assim, a presença dos lipossomos modifica a curva do potencial transmembrana na membrana nuclear, e não poderia ser tratada como referencial para validação.

Observa-se que as curvas referentes à membrana plasmática são semelhantes, inclusive com os pontos máximos de V_{m_p} localizados em torno de 4 ns, atingindo um potencial de aproximadamente 1,6 V. O erro calculado foi menor que 5%. A partir dessa etapa de validação, considera-se que o sistema implementado no COMSOL está apto a servir de base para os estudos posteriores deste trabalho.

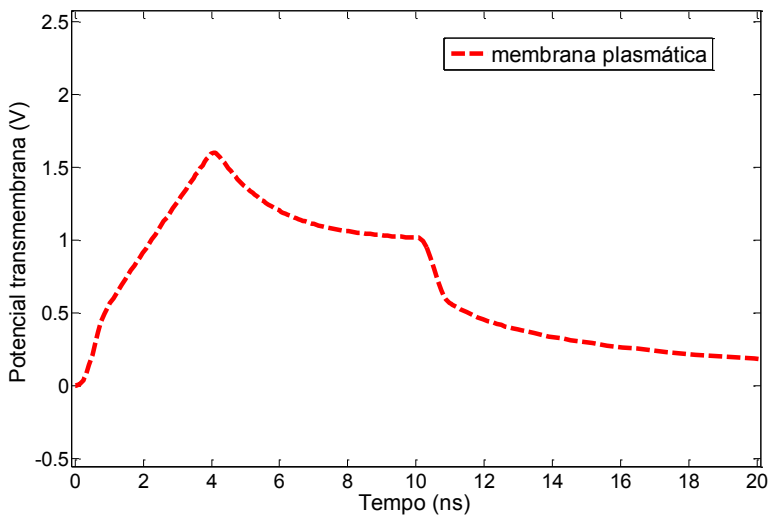
Após a validação, foi definido qual seria o ângulo θ utilizado para a análise dos efeitos nas membranas. Para tanto, considerando os mesmos dados empregados na validação segundo o artigo de RETELJ *et al.* (2013), obteve-se as curvas do potencial transmembrana V_m nas membranas plasmática e nuclear com o ângulo θ variando entre 0° e 90°. Na Figura 10, estão as curvas que representam V_m , após a aplicação de um pulso elétrico de 2 kV/cm e 10 ns de duração, para diferentes intervalos de tempo ao longo desses 10 ns.

Figura 8 - Curva dos potenciais transmembranas extraídas de RETELJ *et al.* (2013).



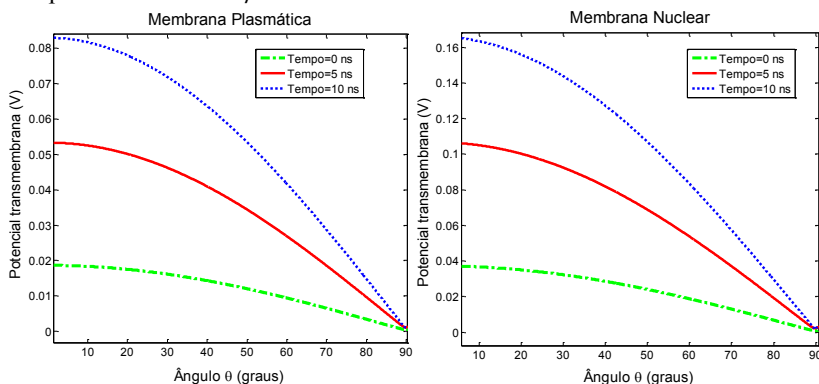
Fonte: RETELJ *et al.* (2013).

Figura 9 - Curva dos potenciais transmembrana obtidas no software COMSOL com base nos dados de RETELJ *et al.* (2013).



Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Curva dos potenciais transmembranas V_{mp} e V_{mn} para ângulos variando entre 0° e 90° em relação às membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 2 kV/cm e 10 ns .



Fonte: Próprio autor.

Assim, pode-se observar o quanto o pulso elétrico aplicado perturba as membranas no decorrer de sua aplicação, e também o quanto essa perturbação é mais acentuada no ponto central da célula, ou seja, em $\theta = 0^\circ$, sendo que a partir de 45° há uma queda brusca de V_m . Esse fato ocorre porque a predominância de abertura dos poros está na região dos polos da célula, que são os pontos onde a membrana celular está mais próxima dos eletrodos. Inclusive pode-se definir que existe uma linha do equador na célula, formada por uma linha imaginária traçada em torno da célula igualmente distante de ambos os polos, dividindo-a em hemisférios norte e sul. Assim, pode-se dizer que o número de nanoporos criados diminui à medida que o ângulo de análise se movimenta dos polos para o equador, ou seja, de 0° para 90° , no caso do intervalo das curvas analisadas. Portanto, optou-se por realizar os estudos em $\theta = 0^\circ$ ao longo deste trabalho.

4.1 ESTUDO DOS PARÂMETROS DO PULSO ELÉTRICO

Com a geometria e o modelo implementados e validados no COMSOL, foi conduzido o estudo da formação dos poros nas membranas plasmática e nuclear, aplicando pulsos elétricos quadráticos

com variações de amplitude e duração, utilizando os parâmetros definidos na seção de Metodologia.

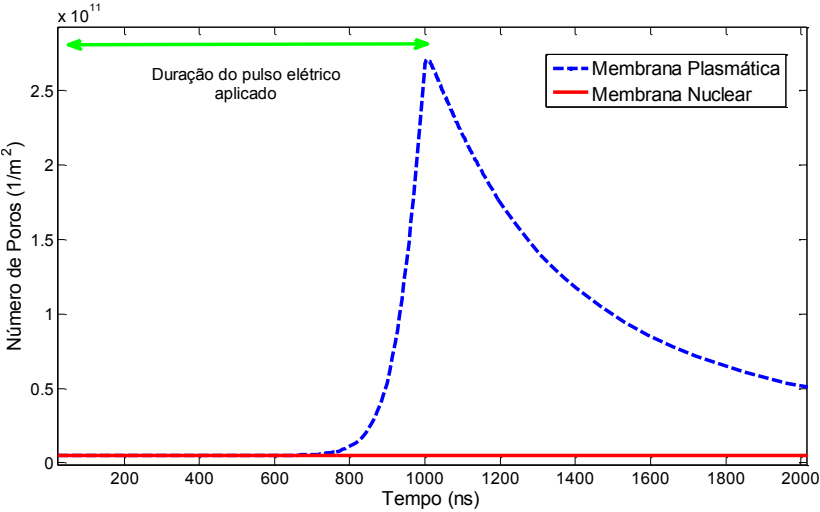
Inicialmente, o modelo foi utilizado para calcular o potencial transmembrana, a condutividade elétrica e a densidade de poros, nas membranas plasmática e nuclear, quando a célula é exposta a um pulso elétrico quadrático de durações de microssegundos e diferentes amplitudes. Um exemplo é apresentado na Figura 11, onde ambas as curvas expressam a densidade de poros para cada membrana, quando aplicado um campo elétrico de 1 kV/cm e duração de $1\mu\text{s}$.

O primeiro microssegundo na figura se refere ao tempo de duração do pulso e o restante da escala ao tempo após o pulso. Nesta configuração, a figura mostra que a membrana plasmática é significativamente eletroporada, enquanto que o núcleo foi mantido praticamente intacto. Este tipo de pulso pode ser utilizado para eletroporar a célula e introduzir DNA até o citoplasma, por exemplo.

Aumentando o campo elétrico para 2 kV/cm e reduzindo a duração do pulso para 100 ns , foram obtidas as curvas mostradas na Figura 12, na qual podem ser observados os efeitos na membrana, em termos de densidade de poros. Observa-se que a abertura de poros agora é predominante na membrana nuclear, porém ainda há poros na membrana plasmática, mesmo que em menor quantidade.

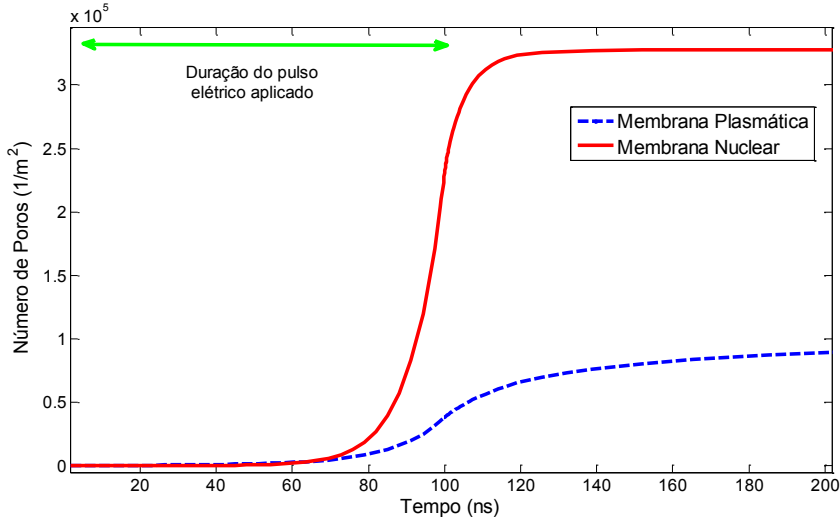
Na sequência, foram aplicados pulsos elétricos na faixa de nanosegundos, a fim de analisar os efeitos de pulsos ultracurtos nas estruturas celulares. Nas Figuras 13, 14 e 15 são mostrados os resultados para um campo elétrico de 12 kV/cm atuando durante 9 ns . A Figura 14 apresenta a densidade de poros, enquanto que a Figura 13 e a Figura 15 apresentam a condutividade elétrica e o potencial transmembrana, respectivamente.

Figura 11 - Densidade de poros para as membranas plasmática e nuclear, sujeitas a um campo elétrico de 1 kV/cm e 1 μ s de duração.



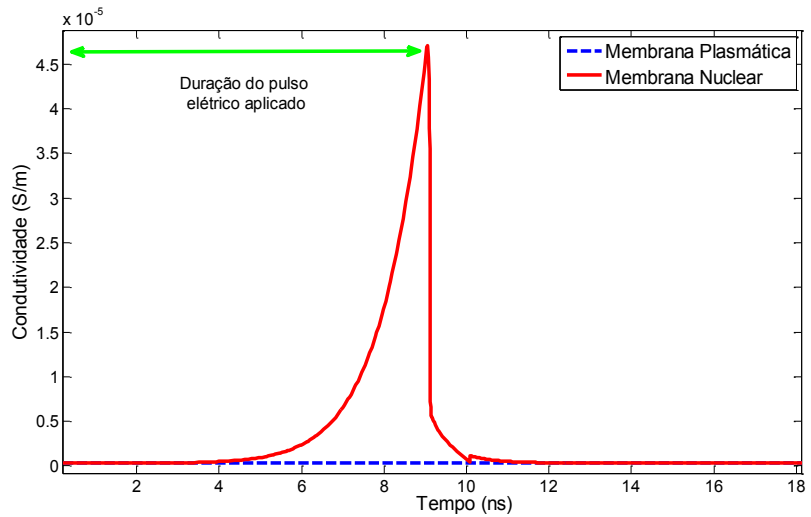
Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Densidade de poros nas membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 2 kV/cm e duração de 100 ns.



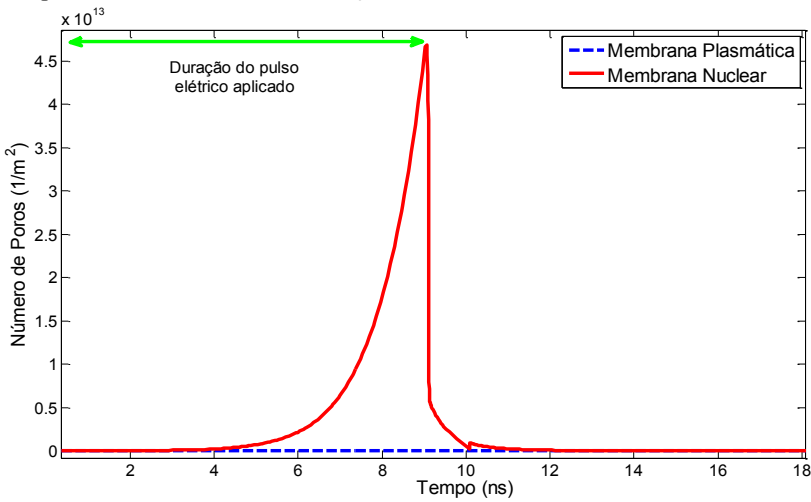
Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Condutividade elétrica das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns.



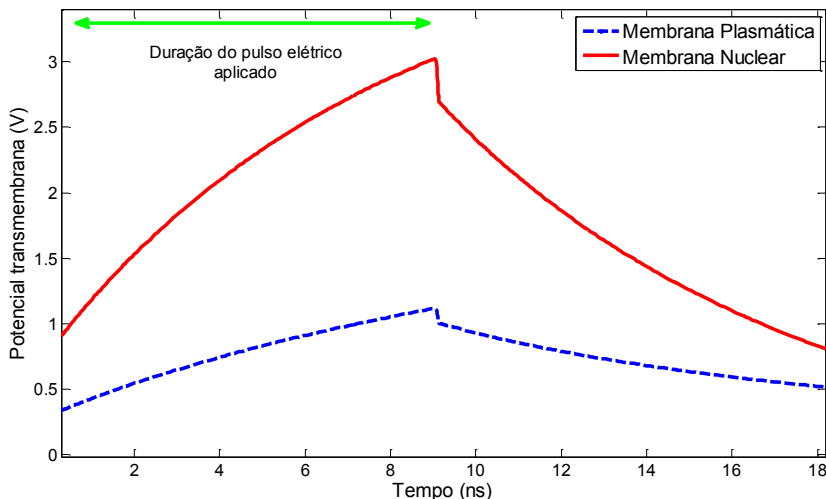
Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Densidade de poros das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns.



Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Potencial transmembrana das membranas plasmática e nuclear, para um campo elétrico de 12 kV/cm e duração de 9 ns.



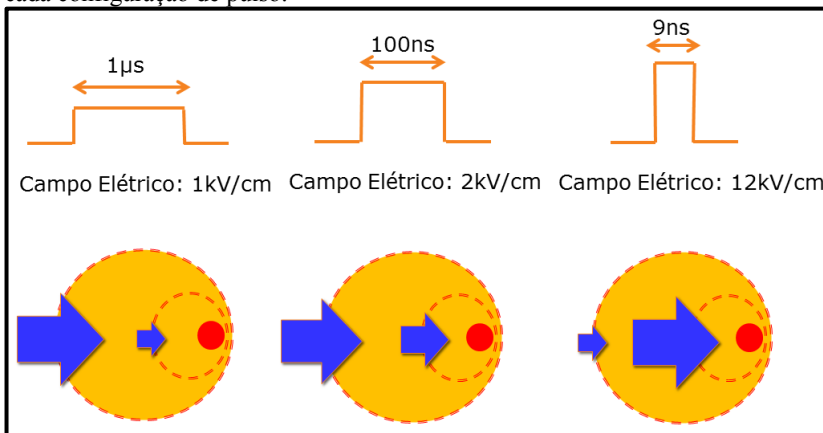
Fonte: Próprio autor.

Na Figura 15, pode-se observar que no início do pulso o potencial transmembrana na membrana plasmática atinge aproximadamente 3 V em poucos nanossegundos e depois decresce até um valor próximo ao potencial de repouso. Esta queda de potencial é devido ao aumento na densidade de poros da membrana (eletroporação), a qual implica no aumento da condutividade e consequentemente reduz a tensão entre as partes interna e externa da membrana. Um comportamento similar é observado na membrana nuclear.

Analisando as Figuras 11, 12 e 14, nota-se que a Figura 12 difere das demais em relação ao comportamento da curva de Nt logo após o final do pulso, mantendo a estabilidade da densidade de poros, enquanto que as demais apresentam uma queda nessa região. Uma possível explicação é que a quantidade de poros formada no caso de pulsos de 2 kV/cm e 100 ns não foi grande o suficiente para reduzir V_m abaixo do limiar da eletroporação, onde a densidade de poros seria reduzida. No entanto, embora a abertura de poros seja pequena nessa configuração de pulso, a sua distribuição não se concentra somente em uma membrana, sendo o diferencial deste par de curvas.

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se compor a Figura 16, a qual expressa resumidamente os efeitos na célula de acordo com cada região de duração e amplitude.

Figura 16 - Resumo dos efeitos nas membranas para os 3 casos estudados. A dimensão das setas indica a predominância de poros em cada membrana para cada configuração de pulso.



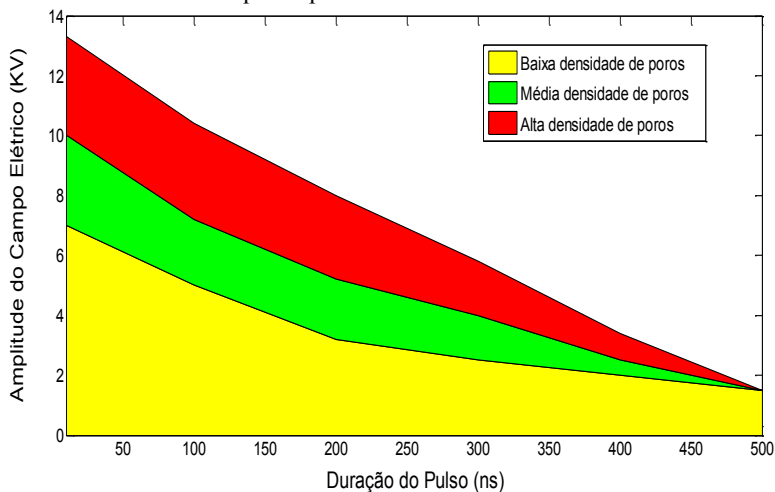
Fonte: Próprio autor.

A escolha da intensidade e duração do campo elétrico depende dos requisitos de cada aplicação, que pode necessitar de maior ou menor número de poros. Conforme descrito na metodologia, outros experimentos foram realizados na faixa de pulsos que fornece uma densidade de poros na membrana nuclear superior a da membrana plasmática. Dessa forma, expandindo-se o estudo para outras regiões, pode-se compor um mapa da nanoeletroporação, com diferentes níveis de densidade de poros, conforme Figura 17.

Na Figura 17, o nível de alta intensidade de poros foi definido quando a relação Nt_{mn}/Nt_{mp} ficou em torno de 10^7 , já o nível de média densidade de poros indica Nt_{mn}/Nt_{mp} da ordem de 10^3 , enquanto que o nível de baixa intensidade é quando Nt_{mn}/Nt_{mp} não excede valores múltiplos de 10^0 .

Um fato que denota a importância da definição de níveis para a abertura de poros nas organelas internas é que campos suficientemente elevados podem atingir o limiar de permeabilização do retículo endoplasmático e induzir a liberação de Ca^{2+} , por exemplo, dentre outros efeitos secundários.

Figura 17 - Mapa da nanoeletroporação para a membrana nuclear, considerando $\sigma_e = 0,1 S/m$. A alta densidade de poros corresponde a 10^7 vezes mais poros na membrana nuclear do que na plasmática.



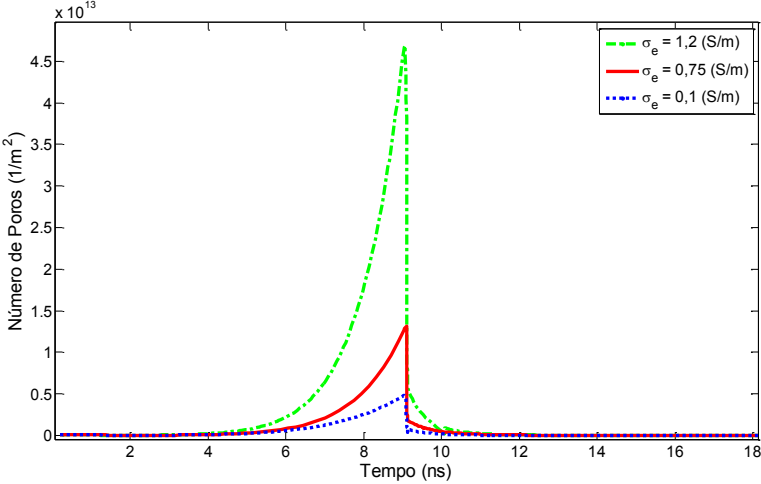
4.2 ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DA SOLUÇÃO

Neste estudo, tem-se como objetivo analisar a influência da condutividade da solução externa na eletroporação da membrana nuclear, tanto de forma individual quanto em conjunto com a razão entre os raios da célula e do núcleo. Para tanto, inicialmente foi verificada a tendência na densidade de poros nas membranas nuclear e plasmática Nt_{mn} e Nt_{mp} , respectivamente, à medida que a condutividade era variada para valores abaixo, acima e dentre as condutividades do nucleoplasma e citoplasma, obtendo-se as curvas expressas nas Figuras 18 e 19.

Observa-se com o aumento da condutividade, a densidade de poros em cada membrana também aumenta. Porém, como o pulso elétrico aplicado foi de curta duração e alta intensidade, na membrana nuclear a eletroporação é mais evidente do que na membrana plasmática. Em ambos os casos verifica-se que há um aumento no número de poros ao longo da aplicação do pulso, sendo que ao final dele, no caso da membrana nuclear, há uma queda característica da

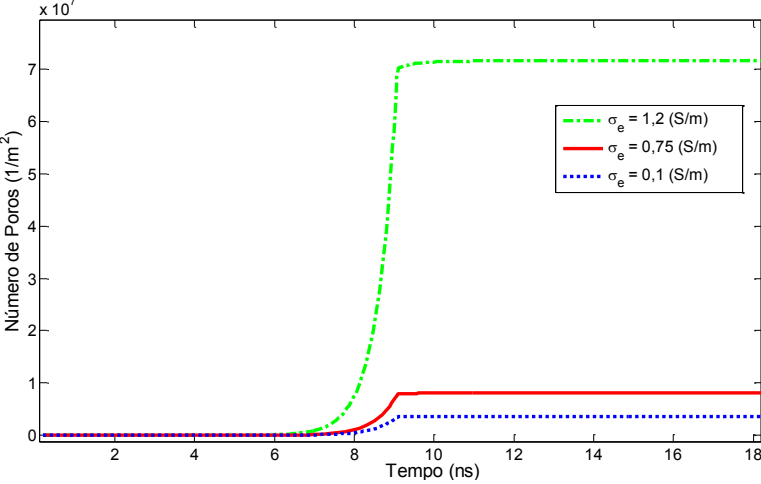
eletroporação, devido à redução do potencial transmembrana e aumento da condutividade.

Figura 18 - Densidade de poros na membrana nuclear para diferentes condutividades extracelular e pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns.



Fonte: Próprio autor.

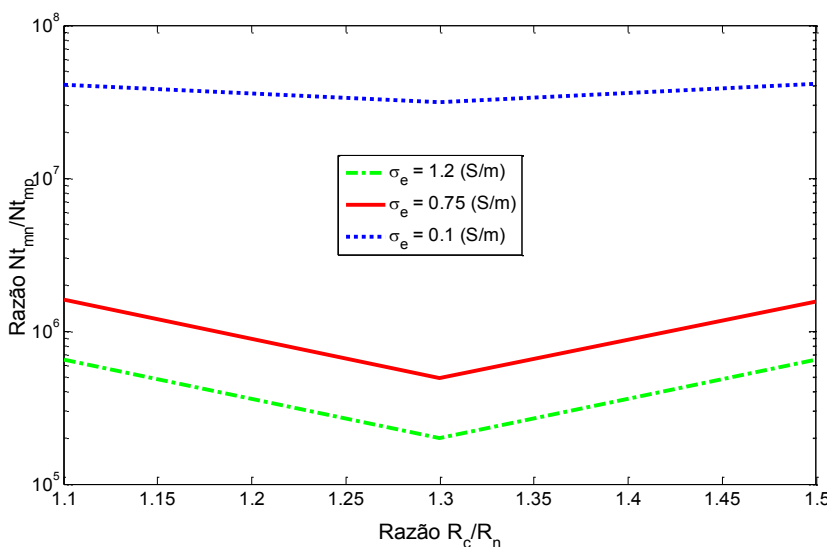
Figura 19 - Densidade de poros na membrana plasmática para diferentes condutividades extracelular e pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns.



Fonte: Próprio autor.

Dando continuidade aos estudos da condutividade extracelular, analisou-se o aumento na razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática (Nt_{mn}/Nt_{mp}) à medida que a razão entre os raios da célula e do núcleo (R_c/R_n) aumentam, considerando a faixa entre 1,1 e 1,3, que são valores condizentes com a literatura encontrada (ANEXO A), relacionada a células reais. Os resultados gráficos obtidos encontram-se na Figura 20.

Figura 20 - Razão entre as densidade de poros nas membranas para diferentes condutividades extracelular e diferentes razões entre os raios celular e nuclear, para um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns.



Fonte: Próprio autor.

Considerando os resultados obtidos, nota-se que à medida que a condutividade externa é reduzida, ocorre um aumento na razão Nt_{mn}/Nt_{mp} . Uma forma de explicar porque isso ocorre é através do tempo de carregamento de uma membrana. De acordo com a equação de τ_m (Equações 11 e 12), este depende das duas condutividades que cercam uma membrana, a externa e a interna, sendo inversamente proporcional a esses valores. Logo, quando as duas condutividades que cercam a membrana plasmática (da solução extracelular e do citoplasma) são menores do que as duas que cercam a da membrana nuclear (citoplasma e nucleoplasma), o tempo de carregamento da membrana plasmática

tende a aumentar em relação a da nuclear. Com isso um pulso de curta duração dificilmente irá atingir o limiar de eletroporação. O tempo de exposição a esse pulso, com V_{mp} suficiente para abertura de poros, é menor do que o tempo que a membrana nuclear fica exposta com V_{mn} suficiente para ser eletroporada.

Em relação a razão entre raios, não há uma relação direta com o aumento na densidade de poros, como pode ser percebida na redução que ocorreu em $R_c/R_n = 1,3$. Isso ocorre porque o estudo foi realizado com valores de células reais para cada razão R_c/R_n , o que implica em diferentes características geométricas e elétricas que resultarão em diferentes tempos de carregamento. O ponto onde houve a queda na curva era o que apresentava o menor valor na relação τ_{mp}/τ_{mn} , e quanto maior essa relação será observado mais a frente que maior serão as evidências da nanoeletroporação.

O principal ponto desse estudo é que um aumento isolado na condutividade da solução provoca aumento na densidade de poros em ambas as membranas. Porém, quando este aumento é avaliado comparativamente entre as membranas, a proporção de poros no núcleo em relação a membrana plasmática aumenta de forma inversa e proporcional a redução da condutividade da solução.

4.3 ESTUDO DO TEMPO DE CARREGAMENTO

O estudo do tempo de carregamento iniciou-se com a construção das relações entre os elementos das Equações 15 e 16, descritas na Metodologia, que permitem $\tau_{mn} < \tau_{mp}$. Dessa forma, para que $\tau_{mn} < \tau_{mp}$, concluiu-se que devem ser atendidas as seguintes relações:

$$R_c > R_n \quad (14)$$

$$d_{mn} > d_{mp} \quad (15)$$

$$\sigma_{np} > \sigma_{cit} > \sigma_e \quad (16)$$

$$C_{mp} > C_{mn} \text{ ou } \varepsilon_{mp} > \varepsilon_{mn} \quad (17)$$

A partir dos dados celulares que compõem os ANEXOS A, B, C e D, é possível confirmar algumas das relações acima, além de $R_c > R_n$.

Os valores de espessura da membrana nuclear foram superiores aos da membrana plasmática em todas as referências encontradas, sendo um indicativo da validade de $d_{mn} > d_{mp}$. Os valores de condutividade do nucleoplasma também foram superiores aos do citoplasma em todos os casos, o que permite atender a relação $\sigma_{np} > \sigma_{cit} > \sigma_e$, pois σ_e é um parâmetro manipulável em laboratório, podendo ser configurado para valores inferiores as outras duas condutividades celulares. Porém, os dados de permissividade não atenderam a relação $\varepsilon_{mp} > \varepsilon_{mn}$ em nenhum dos artigos encontrados, assim como os dados de capacitância foram encontrados tanto atendendo a relação $C_{mp} > C_{mn}$ quanto não a atendendo.

Em relação às ordens de grandeza de cada parâmetro, tem-se o raio como sendo da ordem de 10^{-6} , a espessura d_m da ordem de 10^{-9} , a condutividade como sendo da ordem de 10^0 , as permissividades da ordem de 10^0 e as capacitâncias da ordem de 10^{-3} . Um resumo das relações entre parâmetros encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1- Resumo das relações entre os parâmetros que compõem os tempos de carregamento das membranas plasmática e nuclear.

Parâmetro	Ordem de grandeza	Relação Esperada	Relação Encontrada
Raios	$10^{-6}[\text{m}]$	$R_c > R_n$	$R_c > R_n$
Espessuras	$10^{-9}[\text{m}]$	$d_{mn} > d_{mp}$	$d_{mn} > d_{mp}$
Condutividades	$10^0[\text{S/m}]$	$\sigma_{np} > \sigma_{cit} > \sigma_e$	$\sigma_{np} > \sigma_{cit} > \sigma_e$
Permissividades	10^0	$\varepsilon_{mp} > \varepsilon_{mn}$	$\varepsilon_{mp} < \varepsilon_{mn}$
Capacitâncias	$10^{-3}[\text{F/m}]$	$C_{mp} > C_{mn}$	$C_{mp} > C_{mn}$ e $C_{mp} < C_{mn}$

Assim, num experimento real, tendo-se os dados inerentes a célula e manipulando a condutividade da solução, é possível obter o tempo de carregamento de cada membrana. Este valor pode auxiliar na definição da duração do pulso elétrico, pois a tendência é que cada membrana quando exposta a um campo elétrico aumente a sua densidade de poros à medida que o tempo de exposição se aproxima do seu tempo de carregamento.

Dessa forma, idealmente, se o objetivo fosse eletroporar a membrana plasmática, o tempo de duração do pulso deveria ser superior a τ_{mp} , sendo que para valores inferiores a tendência seria que a permeabilidade permanecesse pouco alterada nessa região. Para que a abertura de poros

se concentrasse na membrana nuclear, o tempo de duração do pulso deveria ser definido para um valor superior a τ_{mn} e inferior a τ_{mp} . Por fim, quando a duração do pulso fosse definida para valores inferiores a ambos os tempos de carregamento, a tendência seria nenhuma membrana eletroporada.

Embora essas relações contribuam para a eletroporação seletiva, a especificação adequada da duração do pulso não é garantida pelos dados de τ_{mp} e τ_{mn} , pois depende também da intensidade do campo elétrico, conforme foi verificado na Figura 17. Além disso, é possível que alguns parâmetros celulares interfiram significativamente na abertura de poros, se sobrepondo a relações diretamente proporcionais ao tempo de carregamento, e isso será investigado no decorrer desta etapa.

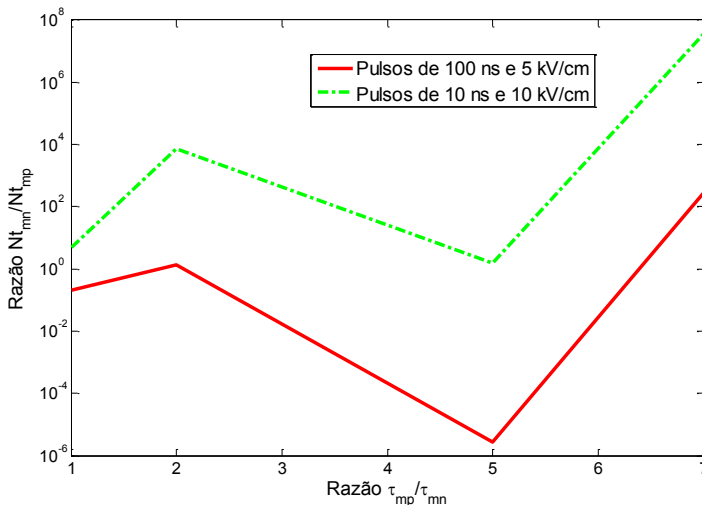
Inicialmente, a fim de verificar a forma como o tempo de carregamento se relaciona com a razão entre a densidade de poros em diferentes faixas de pulsos, foram obtidas as curvas da Figura 21, expressas em escala logarítmica. Foram analisados $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 1,1$ (linfócitos), $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 2,3$ (células B16-F1), $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 5,1$ (células teóricas) e $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 7,8$ (células B Normais), conforme dados dos ANEXOS A, B, C, D e E, utilizando dois tipos de pulsos.

Observa-se que o pulso da ordem de $100ns$ e 5 kV/cm tende a manter a relação Nt_{mn}/Nt_{mp} abaixo de um, até uma certa faixa, indicando que a predominância de poros abertos é justamente na membrana plasmática neste caso. Por sua vez, pulsos mais curtos, da ordem de 10 ns e 10 kV/cm , elevam a curva Nt_{mn}/Nt_{mp} para valores acima de um, já que a abertura de poros predomina na membrana nuclear nesta configuração.

Na Figura 21, um aumento no tempo de carregamento não implicou diretamente num aumento da razão Nt_{mn}/Nt_{mp} em todos os casos, como pode ser observado para $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 5,1$, onde houve uma queda ao invés de manter o crescimento da curva como nos demais casos. Diversos fatores podem ter implicado nesse resultado, sendo um deles o baixo tempo de carregamento da membrana plasmática desta célula teórica, em torno de 59 ns , enquanto que as demais eram de 87 ns , 96 ns e 267 ns , e isso pode ter favorecido um pequeno aumento em Nt_{mp} em relação às demais células. Outro fator poderia ser o tamanho do raio celular ser de $R_c = 10\mu m$, enquanto que os dos pontos iniciais de razão τ_{mp}/τ_{mn} iguais a 1,1 e 2,2 apresentam raios de $2,9\mu m$ e $3,3\mu m$, respectivamente. O último ponto, de razão $\tau_{mp}/\tau_{mn} = 7,8$, apesar de ter um raio celular de $11,4\mu m$, apresenta um tempo de

carregamento da membrana plasmática bastante elevado, em torno de 267 ns , o que contribuiu para amenizar a influência de R_c na razão entre as densidades de poros.

Figura 21 – Relação entre Nt_{mn}/Nt_{mp} e τ_{mp}/τ_{mn} , para pulsos elétricos curtos e médios, considerando diferentes células biológicas e $\sigma_e = 0,1\text{ S/m}$.



Fonte: Próprio autor.

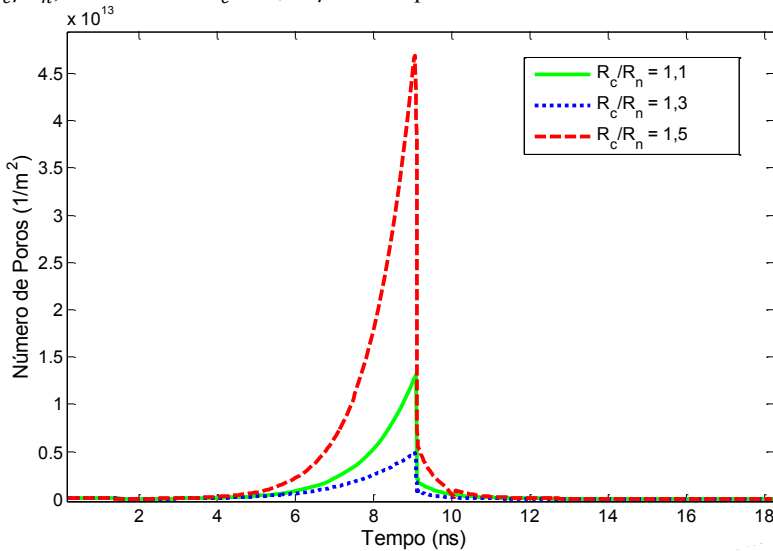
Apesar de algumas exceções como essa analisada (que inclusive pertencia a uma célula teórica que foi inclusa propositalmente) pode-se dizer que, de forma geral, quanto maior o tempo de carregamento da membrana plasmática em relação ao tempo de carregamento da membrana nuclear, maior a predominância de abertura de poros na membrana nuclear. Isto acontece porque a membrana nuclear tem um tempo de carregamento mais curto e entra nesta região de carga antes do que a membrana plasmática e, portanto, fica mais tempo com um V_{mn} que permite a abertura de poros enquanto está exposta ao pulso elétrico.

Na sequência, foi estudada a abertura de poros em cada membrana à medida que a razão entre raios era alterada, a partir da utilização das células B Normais ($R_c/R_n = 1,1$), linfócitos ($R_c/R_n = 1,3$) e células B16-F1 ($R_c/R_n = 1,5$), obtendo-se os resultados descritos nas Figuras 22 e 23. As figuras foram obtidas no modo temporal para 3 valores de razões entre raios, e expressam a densidade de poros na membrana nuclear (Figura 22) e plasmática (Figura 23), para um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns de duração e condutividade extracelular de $0,1\text{ S/m}$.

Pode-se notar que o crescimento na abertura de poros foi de acordo com o tempo de carregamento de cada célula biológica empregada no estudo, e não diretamente proporcional a razão entre os raios. Desta forma, buscou-se analisar na sequência a influência de R_c e R_n individualmente, variando apenas esses parâmetros e mantendo-se todos os demais, referentes a célula B16-F1 (Tabela 3).

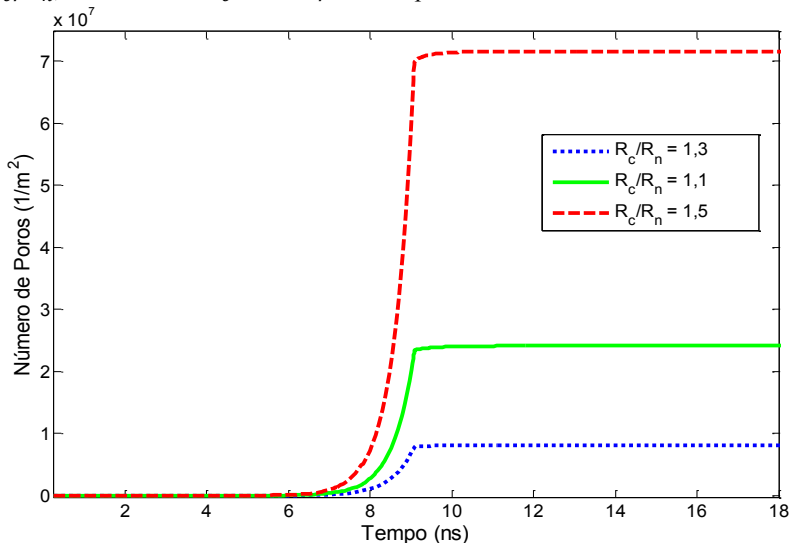
A Figura 24 refere-se a curva obtida para variações de R_m entre os seus valores mínimo ($R_m = 2,9 \mu m$) e máximo ($R_m = 11 \mu m$) encontrados conforme ANEXO A, enquanto que R_n foi fixado em seu valor mínimo $R_n = 2,2 \mu m$, a fim de não superar R_m em nenhum ponto. O pulso aplicado foi de 12 kV/cm e 9 ns de duração.

Figura 22 - Número de poros na membrana nuclear para diferentes razões R_c/R_n , considerando $\sigma_e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns .



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Número de poros na membrana plasmática para diferentes razões R_c/R_n , considerando $\sigma_e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso elétrico de 12 kV/cm e 9 ns .

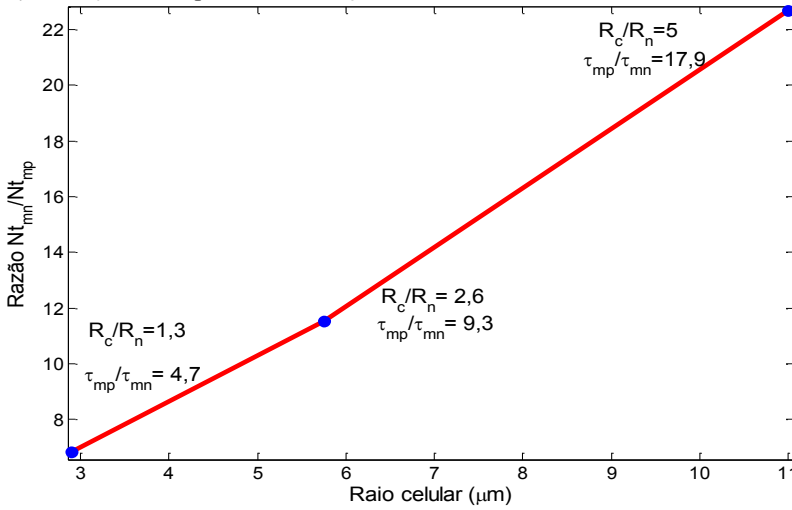


Fonte: Próprio autor.

Conforme Figura 24, à medida que o raio celular varia, a relação R_c/R_n também varia, pois o parâmetro R_n foi fixado. O aumento nesta relação geométrica provocou um aumento na relação entre os tempos de carregamentos τ_{mp}/τ_{mn} . Como resultado, pode-se observar que a razão entre as densidades de poros na membrana nuclear e plasmática Nt_{mn}/Nt_{mp} formou uma curva com taxa de crescimento positiva ao longo desse processo. Logo, existe uma relação direta entre o raio celular e a nanoeletroporação, desde que não haja interferência de outros parâmetros em sentido oposto.

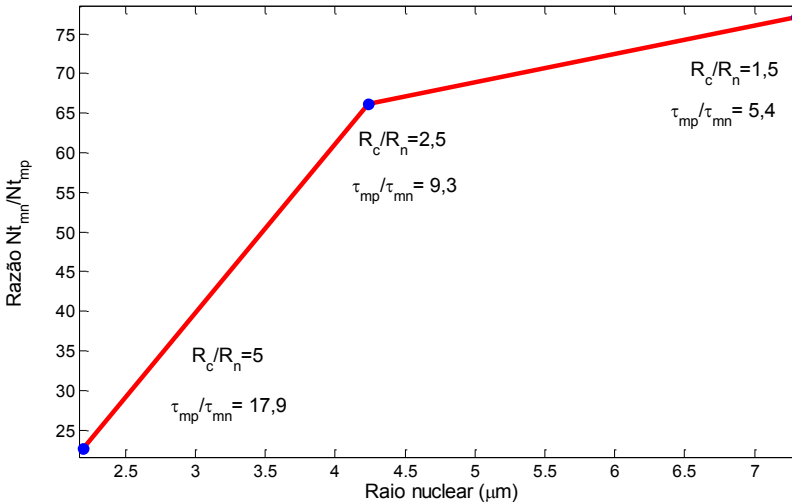
Na Figura 25, tem-se a curva obtida para variações do raio nuclear desde o seu valor mínimo ($R_n = 2,2 \mu\text{m}$) até o seu valor máximo ($R_n = 7,3 \mu\text{m}$), conforme ANEXO A, mantendo o raio celular em seu valor máximo $R_c = 11 \mu\text{m}$, a fim de garantir que seja superior ao núcleo em todos os pontos. O pulso aplicado foi de 12 kV/cm e 9 ns de duração.

Figura 24 – Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações do raio celular, considerando uma célula B16-F1 de $R_n = 2,2 \mu\text{m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns .



Fonte: Próprio autor.

Figura 25 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações do raio celular, considerando uma célula B16-F1 de $R_n = 2,2 \mu\text{m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns .



Fonte: Próprio autor.

As variações no raio nuclear implicaram em variações inversamente proporcionais na relação R_c/R_n , pois o raio celular foi mantido fixo. Obtendo-se os tempos de carregamento para ambas as membranas, observa-se que τ_{mp}/τ_{mn} foi reduzido à medida que R_n aumentava e R_c/R_n decrescia. Dessa forma, o aumento na razão entre as densidades de poros Nt_{mn}/Nt_{mp} foi diretamente proporcional a R_n , porém inversamente proporcional a R_c/R_n e τ_{mp}/τ_{mn} . Esse fato está relacionado ao potencial transmembrana V_{mn} , que depende diretamente do raio nuclear, conforme Equações 5 e 9.

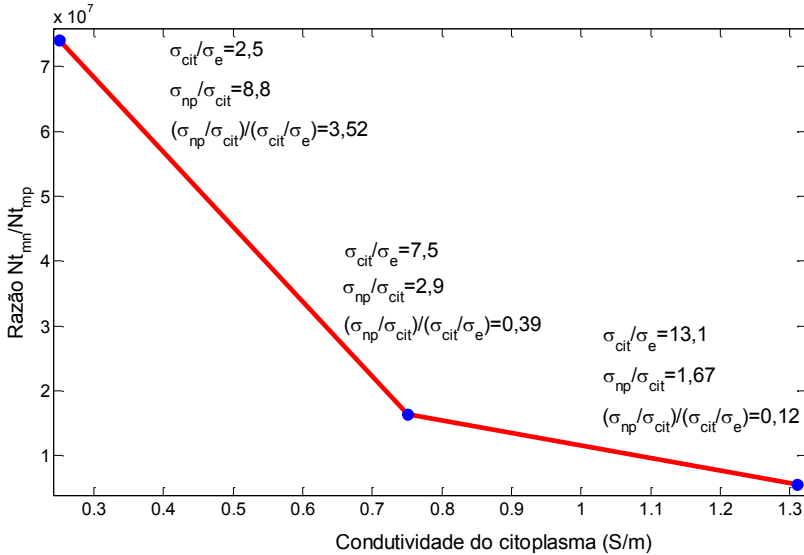
Posteriormente, foi realizado um estudo envolvendo variações de condutividade do citoplasma e nucleoplasma, que são parâmetros intrínsecos a cada célula biológica, considerando-se os demais parâmetros conforme a célula B16-F1.

A primeira análise consistiu na fixação da condutividade do nucleoplasma em $\sigma_{np} = 2,2 S/m$ e na da solução extracelular em $\sigma_e = 0,1 S/m$, enquanto a condutividade do citoplasma era variada entre seus valores mínimo ($0,25 S/m$) e máximo ($1,31 S/m$), conforme ANEXO B. Aplicando-se um pulso elétrico de $12 kV/cm$ e $9 ns$ de duração, obteve-se a curva da Figura 26, na qual pode-se observar que à medida que σ_{cit} aumenta, a razão Nt_{mn}/Nt_{mp} diminui.

Para fins de melhor entendimento do processo, calculou-se as relações entre as condutividades que delimitam cada membrana, isto é, σ_{cit}/σ_e no caso da membrana plasmática e σ_{np}/σ_{cit} para a membrana nuclear. Uma vez que σ_e e σ_{np} foram fixados em $\sigma_e = 0,1 S/m$ e $\sigma_{np} = 2,2 S/m$, um aumento da condutividade do citoplasma provoca um aumento em σ_{cit}/σ_e e uma redução em σ_{np}/σ_{cit} . A razão entre as duas relações também foi obtida, sendo observado que $(\sigma_{np}/\sigma_{cit})/(\sigma_{cit}/\sigma_e)$ foi reduzido quando a condutividade do citoplasma aumentou.

A partir dessa análise, pode-se dizer de forma preliminar que um aumento na condutividade do meio interno a uma membrana, contribui para o aumento na densidade de poros dessa membrana. Por isso o aumento da condutividade do citoplasma incrementou o número de poros na membrana plasmática, reduzindo Nt_{mn}/Nt_{mp} .

Figura 26 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da condutividade do citoplasma, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_{np} = 2,2 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns .

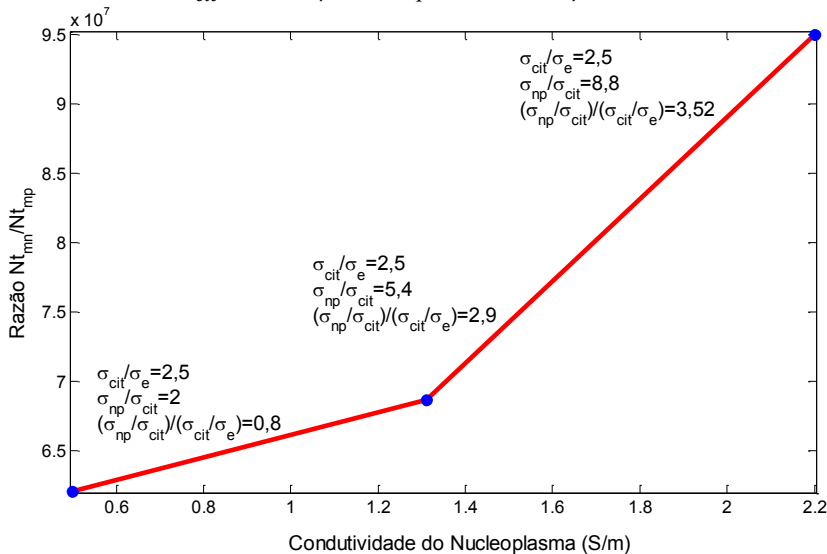


Fonte: Próprio autor.

A análise posterior verificou a influência da variação da condutividade do nucleoplasma σ_{np} desde seu valor mínimo ($0,5 \text{ S/m}$) até o seu valor máximo ($\sigma_{np} = 2,2 \text{ S/m}$), conforme ANEXO B. A condutividade do citoplasma foi fixada em $\sigma_{cit} = 0,25 \text{ S/m}$, enquanto que a da solução extracelular ficou em $\sigma_e = 0,1 \text{ S/m}$. O pulso elétrico foi definido como sendo de 12 kV/cm e 9 ns de duração, resultando na Figura 27.

Observa-se que um aumento na condutividade do nucleoplasma aumentou a razão entre as densidades de poros na membrana nuclear e plasmática, pois como no caso anterior, um aumento na condutividade interna a membrana tende a aumentar a predominância de poros nessa região.

Figura 27 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da condutividade do nucleoplasma, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_{cit} = 0,25 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns .

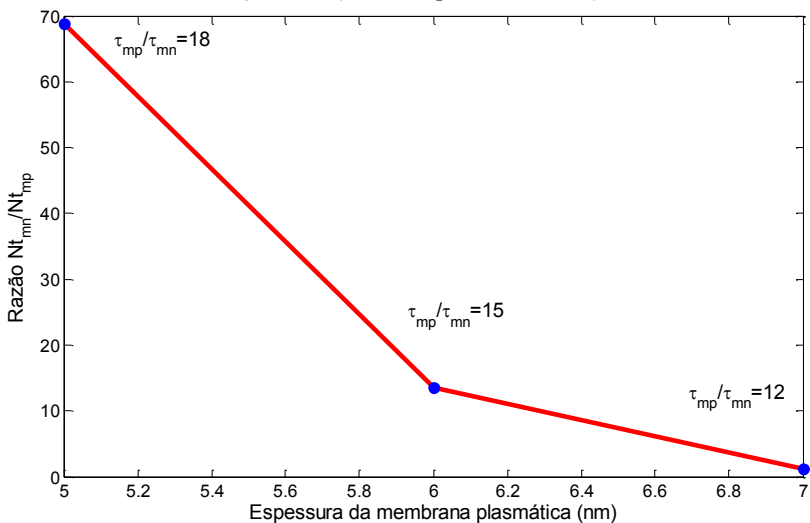


Fonte: Próprio autor.

Prosseguindo com o estudo dos parâmetros que interferem na nanoeletroporação, foi analisada a influência da espessura das membranas. Na Figura 28 encontra-se a curva da razão Nt_{mp}/Nt_{mn} em função da variação da espessura da membrana plasmática d_{mp} entre seus valores mínimo ($d_{mp} = 5 \text{ nm}$) e máximo ($d_{mp} = 7 \text{ nm}$), para uma espessura da membrana nuclear fixada no valor padrão $d_{mn} = 40 \text{ nm}$. A solução extracelular foi configurada em $0,1 \text{ S/m}$, e o pulso aplicado foi de 12 kV/cm e 9 ns .

Conforme era previsto, com um aumento em d_{mp} houve redução da relação entre poros na membrana nuclear sobre a plasmática, pois este parâmetro é inversamente proporcional a τ_{mp} . Assim, aumentando-se d_{mp} , reduz-se τ_{mp} e, portanto, o início da abertura de poros na região externa da célula ocorre antecipadamente. A relação τ_{mp}/τ_{mn} confirma esse fato, pois iniciou em 18 e decresceu para 12, passando por 15 em seu valor médio, conforme Figura 28.

Figura 28 – Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da espessura da membrana plasmática, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_e = 0,1 S/m$ e um pulso de $12 kV/cm$ durante $9 ns$.



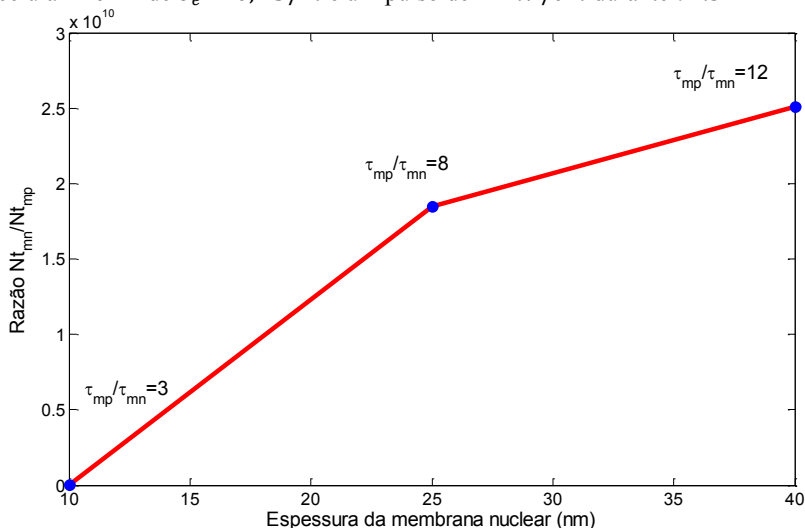
Fonte: Próprio autor.

As variações da espessura da membrana nuclear estão expressas na Figura 29, para d_{mn} variando entre seu valor mínimo ($10 nm$) e máximo ($40 nm$) e d_{mp} fixado em seu valor médio ($7 nm$). A solução extracelular foi configurada em $0,1 S/m$, e o pulso aplicado foi de $12 kV/cm$ e $9 ns$. Verifica-se que com um aumento na espessura da membrana nuclear, ocorre um aumento na relação entre os tempos de carregamento τ_{mp}/τ_{mn} , e consequente predominância de poros na membrana nuclear, como pode ser visto através do crescimento da curva da razão Nt_{mp}/Nt_{mn} .

A seguir, foi analisada a variação da permissividade das membranas plasmática e nuclear, parâmetros também envolvidos no tempo de carregamento, com a condutividade extracelular fixada em $0,1 S/m$ e pulsos de $12 kV/cm$ e $9 ns$ de duração. Variou-se as permissividades da membrana plasmática entre seus valores mínimo ($4,5$) e máximo ($12,8$), mantendo-se $\epsilon_{mn} = 68,32$ (valor padrão). De forma análoga, as permissividades da membrana nuclear foram analisadas entre seus valores mínimo (7) e máximo (108), para $\epsilon_{mp} = 8,9$ (valor padrão). Para estes dois casos, foi verificado como Nt_{mn}/Nt_{mp} se modifica ao longo das variações de permissividades,

resultando na Figura 30 (variação da permissividade da membrana nuclear) e Figura 31 (variação da permissividade da membrana plasmática).

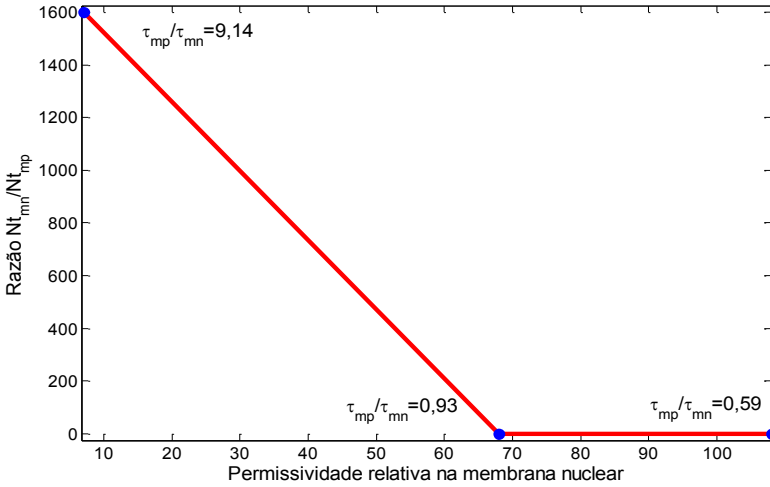
Figura 29 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da espessura da membrana nuclear, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_e = 0,1 \text{ S/m}$ e um pulso de 12 kV/cm durante 9 ns .



Fonte: Próprio autor.

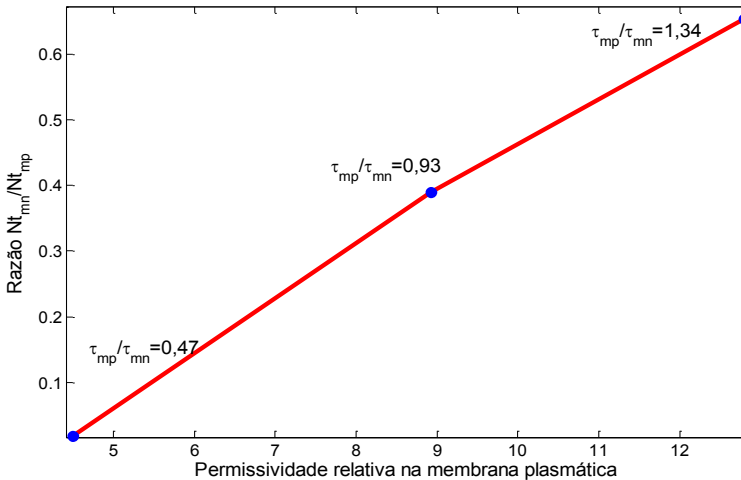
Com base na Figura 30, tem-se que o aumento da permissividade da membrana nuclear implicou na redução da razão entre os tempos de carregamento τ_{mp}/τ_{mn} , e consequente redução da razão entre as densidades de poros Nt_{mn}/Nt_{mp} . Por outro lado, na Figura 31, pode-se observar que à medida que a permissividade da membrana plasmática aumenta, a razão τ_{mp}/τ_{mn} também aumenta, assim como Nt_{mn}/Nt_{mp} .

Figura 30 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da permissividade relativa da membrana nuclear, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_e = 0,1 S/m$ e um pulso de $12 kV/cm$ durante $9 ns$.



Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Razão entre as densidades de poros nas membranas nuclear e plasmática para variações da permissividade relativa da membrana plasmática, considerando uma célula B16-F1 de $\sigma_e = 0,1 S/m$ e um pulso de $12 kV/cm$ durante $9 ns$.



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÕES

Os estudos realizados neste trabalho, através de simulações numéricas, foram conduzidos com o objetivo de analisar o processo de formação de poros nas membranas plasmática e nuclear de uma célula biológica isolada. Os resultados obtidos demonstraram que um dos principais fatores que permitem a eletroporação seletiva é a diferença entre os tempos de carregamento para cada uma das membranas, sendo que o tempo necessário para a membrana plasmática ser carregada demonstrou ser superior ao tempo necessário para a membrana nuclear.

Uma possível explicação para este comportamento é que a redução da duração dos pulsos elétricos aplicados para valores abaixo do tempo de carregamento da membrana plasmática causa um forte aumento na probabilidade de interações do campo elétrico com as estruturas intracelulares, devido as correntes de deslocamento. No caso de campos com amplitudes muito elevadas, os pulsos tem acesso ao interior da célula através de correntes de condução fluindo pela membrana plasmática permeabilizada (SCHOEMBACH *et al.*, 2007).

Entende-se por correntes de deslocamento aquelas que não são resultantes do movimento de cargas elétricas, e só existem quando a tensão entre as “placas” de um elemento capacitivo for variável com o tempo. Se a tensão for constante, as correntes de deslocamento existirão apenas em estado transitório, desaparecendo em seguida. Assim, pode-se dizer que esse tipo de corrente é resultante da propagação de energia na forma de um campo eletromagnético estabelecido entre as placas, nesse caso, entre as superfícies interna e externa da membrana. As correntes de condução são caracterizadas pela troca de elétrons entre um condutor, que neste caso é a membrana permeabilizada.

A partir dos efeitos apontados pelo modelo matemático da eletroporação em células biológicas descritas pelo sistema implementado no COMSOL, pulsos de curta duração e alta intensidade demonstraram ser capazes de perturbar a membrana nuclear. Outros estudos teóricos também apontaram para a existência desse fenômeno, ligado ao tempo de carregamento de diferentes membranas (KOTNIK e MIKLAVČIČ, 2006; GOWRISHANKAR *et al.*, 2006; RETELJ *et al.*, 2013). Porém, na maioria deles não são descritos detalhadamente o que influencia nesse processo e como obter as melhores configurações para o sistema, objetivo desse trabalho.

Diversos parâmetros celulares influenciam no processo de eletroporação, como o tamanho, a forma e o estado (fisiológico ou

patológico) das células. Uma célula de maior tamanho apresenta maior capacidade de concentração do campo externo do que uma célula menor, como consequência, o potencial transmembrana será mais elevado. O tamanho de uma célula também interfere de forma proporcional na capacitância, devido ao aumento da área da superfície, logo, carrega mais lentamente do que uma estrutura menor.

A forma celular também é um fator que interfere na interação entre o campo elétrico e o alvo biológico, porém, a maior parte dos artigos considera a célula como esférica, isolada e homogênea, até mesmo porque células de mamíferos são tipicamente esféricas em suspensões. Um caso em que são analisadas três formas diferentes: esferoide, esferoide oblato e esferoide prolato está em HU e JOSHI (2009), tendo sido verificado que a eletroporação ocorre nos três casos, sendo que as células do tipo esferoides prolatas são mais difíceis de eletroporar do que as oblatas, por exemplo.

O estado fisiológico ou patológico de uma célula influencia em suas propriedades geométricas e dielétricas, como tamanho, espessura, condutividade e permissividade. Células normais diferem de células neoplásicas em relação a resposta aos pulsos elétricos, conforme foi demonstrado em VERNIER *et al.* (2004), para células de glioma de rato, sendo verificado que eram mais resistentes aos pulsos do que Jurkat normais, suportando amplitudes de 200 e 400 kV/cm e durações de 10 ns, o que seria considerado como letal para células Jurkat.

Neste trabalho, foi abordado o tamanho e o estado, sendo mantida a forma celular como esférica. O tamanho deu-se a partir de variações nos raios da célula e do seu núcleo, enquanto que o estado se refletiu em diferentes valores de espessuras, condutividades e permissividades, que fizeram parte do banco de dados composto para o estudo, onde havia células normais e malignas. A eletroporação convencional e a nanoeletroporação foram estudadas utilizando diferentes configurações de pulsos aplicados a um ângulo de 0° com a horizontal.

Com base no modelo da eletroporação, a densidade de poros criada é dependente do potencial transmembrana e das constantes de tempo das membranas. Além disso, o tempo para a criação dos poros é inversamente proporcional a intensidade do campo elétrico, e isso pode ser explicado pelo fato que quanto maior o campo, mais rapidamente o V_m crítico será atingido. Para os experimentos, considerou-se o V_m crítico como sendo 300 mV, assim, cada vez que houver ultrapassagem desse valor, considera-se que há V_m suficiente para desencadear o processo de transformação de poros hidrofóbicos em hidrofílicos, conforme a teoria da permeabilização da membrana.

Os resultados foram apresentados na forma de respostas temporais, a fim de melhor visualizar as fases da eletroporação, em que inicialmente há um aumento do potencial transmembrana, aumentando a condutividade e rompendo a membrana através da criação de poros, conforme Figura 15. Em seguida, as curvas demonstram que o potencial transmembrana e a condutividade (Figura 13) apresentam uma queda, devido a própria abertura dos poros, que permite a troca de íons entre os meios externo e interno. O patamar atingido por cada membrana é praticamente o mesmo, quando ocorre a eletroporação, porém, há uma pequena diferença na resposta inicial da membrana, sendo que a membrana nuclear atinge o limiar em um período de tempo menor.

O efeito de pulsos de nanossegundos já foi demonstrado em organelas internas, tais como nos grânulos intracelulares (SCHOENBACH *et al.*, 2001), endocitose de vesículas (NAPOTNIK *et al.* 2010), endocitose de grandes vacúolos (TEKLE *et al.*, 2005) e liberação de cálcio em retículo endoplasmático (BEEBE *et al.*, 2003). Assim, considerou-se a hipótese de que determinadas configurações poderiam afetar a membrana nuclear, e permitir que o DNA do plasmídeo que encontra-se no citoplasma tenha acesso ao núcleo para ser expresso. A presença de plasmídeo no citoplasma requer permeabilização da membrana por pulsos longos e de menor intensidade do que os requeridos pela nanoeletroporação. Esses aspectos foram verificados e os resultados foram satisfatórios, pois em certas faixas de duração e amplitude é possível concentrar a densidade de poros em uma determinada membrana, como apresentado nas Figuras 11, 12 e 14, que expressam a densidade de poros, assim como na Figura 17, que apresenta o mapa da nanoeletroporação.

Um aspecto que corrobora para a possibilidade de entrada de macromoléculas de DNA nas membranas é a presença da rede de proteínas citoesqueléticas, composta sobretudo pelas proteínas denominadas espectrina, actina e anquirina. Assim, um eletroporo formado por um rompimento na membrana será delimitado por um orifício na rede do citoesqueleto, que tende a ser uma estrutura mais estável e com maior dimensão. Em SUKHORUKOV *et al.* (2005) é abordada a questão do citoesqueleto, inclusive sugerindo que condições hipotônicas do meio extracelular aumentam a eficiência da eletrotransfecção, pois a osmolaridade superior da célula tende a atrair os componentes da solução.

Além da eletrotransfecção, foi verificado na literatura que campos da ordem de nanossegundos provocam efeitos secundários nas membranas, como apoptose, entrega de citocromo-c (pequena proteína

associada à membrana interna da mitocôndria), deslocamento de fosfatidilserina, transporte de pequenas quantidades de iodetos de propídeos através da membrana, absorção de calceínas em grânulos subcelulares e ativação de caspases.

As caspases são um grupo de proteases encontradas na forma inativa no citoplasma celular. Elas são fundamentais no processo de apoptose celular, pois clivam outras proteínas da célula, geralmente ligadas a uma DNase no citoplasma, que se torna ativa, entrando no núcleo e cortando pontos específicos do DNA, desencadeando o processo de morte celular programada. Essa abordagem da apoptose vem sendo testada *in vitro* e *in vivo* em animais para induzir a morte programada de células cancerígenas e reduzir o tamanho dos tumores.

Neste estudo, foi considerado que os poros abertos são de escala nanométrica (da ordem de $0,8\text{ nm}$) e não se expandiram ao longo do processo. Essa consideração é válida devido a curta duração e alta intensidade dos pulsos aplicados, que faz com que a criação dos poros seja superior a sua expansão. Da mesma forma, as condutividades do citoplasma e do nucleoplasma foram consideradas como constantes ao longo do processo, apesar da possível troca de líquidos entre os meios interno e externo durante a permeabilização da membrana.

Um estudo de GOWRISHANKAR *et al.* (2006) sugere que pulsos de alta intensidade e curta duração tendem a permeabilizar a membrana de forma específica, limitando a entrada de moléculas neutras menores como água, açúcares e pequenos íons monovalentes, o que auxiliaria na manutenção das condutividades do citoplasma e nucleoplasma. Além disso, como a maioria dos produtos bioquímicos essenciais é retido, isso retarda ou evita a necrose, e possibilita tempo para o desencadeamento de um ou mais mecanismos de apoptose.

Um aspecto que também foi observado neste trabalho é que o projeto de microdispositivos para a aplicação de pulsos de nanossegundos e altas intensidades depende de diversos fatores, tais como o tamanho celular, os custos do material do substrato e dos muitos passos envolvidos no processo de produção (fotolitografia, decapagem e limpeza). Há células com diâmetros de $5\text{ }\mu\text{m}$ (*S. cerevisiae*), $10\text{ }\mu\text{m}$ (células de leucemia promielocítica humana, eritrócitos, células HT-60, células HELA e diversas células endoteliais), $20\text{ }\mu\text{m}$ (células de adenocarcinoma da próstata e hepatócitos de ratos), 200 nm (vesículas artificiais) e outras que variam entre 2 e $35\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, conforme pode ser observado nos dados contidos no ANEXO A. As configurações do dispositivo são feitas em termos de magnitude e

duração do pulso elétrico, para um dado campo elétrico requerido, de acordo com a aplicação.

A definição da duração do pulso está associada ao tempo de carregamento da membrana a ser eletroporada, enquanto que a amplitude define se o processo será reversível ou irreversível. Cada membrana apresenta um tempo de carregamento específico, conhecendo-se esse valor pode-se configurar o pulso elétrico para valores inferiores ou superiores a ele, sendo que valores inferiores aumentam as chances de abertura de poros nessa membrana.

Neste trabalho, também foram estudadas combinações de duração e amplitude que provocam um dado potencial transmembrana final. Observou-se que existe uma relação entre V_m final e o de repouso, sendo que valores de V_m em repouso em torno de 1,1 V apresentaram bons resultados na eletropermeabilização. Dessa forma, utilizando a equação de V_m pode-se definir um equilíbrio entre os valores de duração e amplitude de acordo com as limitações do dispositivo empregado. Porém, a tendência sempre será de que pulsos curtos e intensos eletroporam organelas internas, enquanto que pulsos longos e mais fracos eletroporam a membrana plasmática, a equação de V_m apenas serve como auxílio para definir os valores exatos desses parâmetros do pulso, dentro da faixa de atuação.

Em relação a condutividade extracelular, observou-se que quanto maior for o valor deste parâmetro, mais facilmente os poros irão se abrir em todas as membranas que compõem a célula. Porém, a predominância de poros com esta configuração ocorre na membrana plasmática. Logo, se o objetivo for aumentar a densidade de poros na membrana nuclear e reduzir na membrana plasmática, como é o caso da segunda etapa da eletrotransfecção, deve-se configurar σ_e para um valor abaixo da condutividade do citoplasma (da ordem de 0,1 S/m). Isso faz com que aumente a diferença entre τ_{mn} e τ_{mp} , facilitando a eletroporação seletiva.

Por fim, fez-se uma análise sobre a influência das características das células biológicas na eletroporação seletiva, com variações de raios celulares e nucleares, espessuras das membranas plasmática e nuclear, permissividades de ambas as membranas e condutividades do citoplasma e nucleoplasma. Observou-se que em células reais, a análise individual dos parâmetros não permite fazer afirmações sobre os efeitos da aplicação de pulsos de curta duração, pois estes efeitos estão fortemente relacionados ao tempo de carregamento das membranas, conforme pode ser visto nas Figuras 22 e 23.

Através da Figura 24, utilizando uma célula teórica onde apenas o raio celular era variado, observou-se que o aumento de R_c implicou em um aumento na densidade de poros nuclear, pois τ_{mp}/τ_{mn} também aumentou. Um fator interessante é que o aumento isolado no raio do núcleo R_n provoca aumento na densidade de poros nessa região, pois o potencial transmembrana V_{mn} depende diretamente deste parâmetro. Isso pode ser visualizado na Figura 25, na qual mesmo com uma redução em τ_{mp}/τ_{mn} quando R_n foi aumentado, a razão entre as densidades de poros aumentou.

Em relação as espessuras, verificou-se que um aumento em d_{mn} provocou um aumento na relação τ_{mp}/τ_{mn} e consequente aumento na abertura de poros na membrana nuclear (Figura 29). Já no caso da espessura da membrana plasmática, um aumento nesse parâmetro provocou redução nas razões entre os tempos de carregamento, e consequente redução nas razões entre as densidades de poros Nt_{mn}/Nt_{mp} (Figura 28).

Os resultados referentes as permissividades apontaram que um aumento na permissividade da membrana nuclear provoca uma redução na razão Nt_{mn}/Nt_{mp} (Figura 30), enquanto que um aumento na permissividade da membrana plasmática provoca um aumento nessa razão (Figura 31). Conforme era esperado, o aumento ou redução na densidade de poros na membrana nuclear foi diretamente proporcional a razão τ_{mp}/τ_{mn} .

Por fim, analisando-se as variações das condutividades do citoplasma e nucleoplasma, concluiu-se que quanto maior for a condutividade do meio interno a uma membrana, maior será a predominância de poros nessa membrana. Assim, um aumento na condutividade do citoplasma reduziu a razão Nt_{mn}/Nt_{mp} (Figura 26), enquanto que um aumento na condutividade do nucleoplasma aumentou essa razão (Figura 27). O fenômeno também é diretamente proporcional a razão entre os tempos de carregamento.

6 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

A eletroporação é uma técnica que vem sendo estudada em inúmeras aplicações, sendo que uma delas é como forma de substituição aos vetores virais e químicos durante a transferência de DNA. No entanto, essa e outras aplicações necessitam da abertura de poros tanto na membrana plasmática quanto na nuclear, o que ainda compõe um desafio na forma como é feito esse processo.

Assim sendo, desenvolveu-se uma metodologia a fim de analisar a influência dos parâmetros duração e amplitude do pulso elétrico aplicado, além da condutividade da solução externa. Essa metodologia foi aplicada em células biológicas com diferentes características, demonstrando a viabilidade da eletroporação seletiva.

Os resultados obtidos demonstraram que pulsos de curta duração (em torno de 10 ns) e alta intensidade (em torno de 10 kV/cm) tendem a formar um maior número de poros na membrana nuclear, preservando a estrutura da membrana plasmática e permitindo que moléculas que estejam no citoplasma sejam conduzidas até o núcleo. Verificou-se ainda que a configuração da condutividade da solução externa para valores em torno de 0,1 S/m facilitam a seletividade da eletroporação, já que aumentam o tempo de carregamento da membrana plasmática em relação ao da nuclear.

Além disso, foi analisada a influência dos parâmetros geométricos da célula, concluindo-se que o aumento do raio nuclear também aumenta a densidade de poros nessa região, já que o potencial transmembrana é diretamente proporcional a esse parâmetro. De forma semelhante, células com maiores espessuras da membrana nuclear terão uma maior densidade de poros nessa região com pulsos de nanossegundos. De forma geral, o fator preponderante para indicar os efeitos nas membranas são os tempos de carregamento, sendo que quanto maior a relação τ_{mp}/τ_{mn} , mais facilmente a nanoeletroporação será identificada.

6.1 TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho, células biológicas foram abordadas em nível geométrico, elétrico e químico com modelos matemáticos, em busca de explicações para o processo de formação de poros nas membranas

plasmática e nuclear. No entanto, ainda há uma série de estudos a serem realizados neste caminho, logo, como propostas de trabalhos futuros, sugere-se:

- Modelagem dos efeitos de campos elétricos pulsados em células biológicas através de modelos analíticos que utilizam a dinâmica molecular, que considera a região da célula como uma coleção de partículas interagindo. Isso possibilitaria a inclusão de detalhes estruturais em nanoescala, aumentando a acurácia. Porém, essa abordagem apresenta intensa complexidade computacional, devido ao imenso número de partículas e pequenos intervalos de tempo, requerendo o uso de *clusters* computacionais de alta velocidade;
- Inclusão dos efeitos dispersivos do potencial transmembrana no modelo assintótico da eletroporação. Uma possibilidade seria considerar as permissividades e condutividades no domínio da frequência, o que permitiria a análise dos processos de relaxamento associados aos dipolos dos fosfolípídios presentes na membrana e também das moléculas de água na superfície da célula;
- Expansão deste estudo para outras formas geométricas de células, assim como verificação da possibilidade de incluir imagens de células reais nas simulações, e realização dos estudos a partir dessas formas. No entanto, a inclusão de outras formas requer a utilização de outros modelos matemáticos, ou até mesmo o desenvolvimento de novos modelos. A utilização de imagens reais também aumenta a complexidade computacional, devido a riqueza de detalhes existentes nas fronteiras da imagem segmentada. Se for utilizado um software como o COMSOL Multiphysics, que trabalha com o método dos elementos finitos, os detalhes das fronteiras também dificultam a discretização (construção da malha);
- Utilização de modelos matemáticos que considerem a expansão dos poros, e não somente o surgimento. Dessa forma, poderia ser encontrada uma relação entre o raio do poro e a tendência da sua reversibilidade ou irreversibilidade ao final da eletroporação;
- Um aspecto que também pode ser estudado é a influência da distância entre eletrodos. Devido à distribuição de campo elétrico, há a possibilidade da variação no processo de eletroporação quando os eletrodos são aproximados ou afastados.

Neste estudo, foram feitos diversos experimentos, variando as distâncias entre $50\ \mu m$ e $1\ mm$, e nenhuma mudança significativa foi observada. A ausência de mudanças nesse caso pode ser decorrente de limitações do modelo matemático ou do sistema empregado, e deve ser investigada futuramente com outros métodos.

- Por fim, a verificação experimental de todos os resultados obtidos teoricamente neste trabalho, o que requer a utilização de dispositivos com grande capacidade de chaveamento, suportando pulsos da ordem de $9\ ns$.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; ZUDANS, I.; WEBER, E. A.; OLOFSSON, J.; ORWAR, O.; WEBER, S. G. Effect of cell size and shape on single-cell electroporation. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 3589-3596, 2007.

ANDRE, F.; MIR, L. M. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. **Gene Therapy**, v. 11, p. S33-S42, 2004.

ANSELMO, J. Eletroporação de células biológicas isoladas através de eletrodo capilar: estudos numéricos dos efeitos elétricos e mecânicos na membrana celular. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

ARNOLD, W. M.; SCHMUTZLER, R. K.; SCHMUTZLER, A. G.; VAN DER VEN, H.; AL-HASANI, S.; KREBS, D.; ZIMMERMANN, U. Electro-rotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 905, n. 2, p. 454-464, 1987.

ASAMI, K.; TAKAHASHI, Y.; TAKASHIMA, S. Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1010, n. 1, p. 49-55, 1989.

BEEBE, S. J.; WHITE, J.; BLACKMORE, P. F.; DENG, Y.; SOMERS, K.; SCHOENBACH, K. H. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. **DNA and Cell Biology**, v. 22, n. 12, p. 785-796, 2003.

BEEBE, S. J.; FOX, P. M.; REC, L. J.; SOMERS, K.; STARK, R. H.; SCHOENBACH, K. H. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 30, n. 1, p. 286-292, 2002.

BEEBE, S. J.; BLACKMORE, P. F.; WHITE, J.; JOSHI, R. P.; SCHOENBACH, K. H. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell

function through intracellular signal transduction mechanisms. **Physiological Measurement**, v. 25, n. 4, p. 1077, 2004.

BERKENBROCK, J. A. Eletroquimioterapia no tratamento de cancer: campos elétricos, eletrodos e modelos de tecidos (*ex vivo*, *in vivo* e *in silico*). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

BLOQUEL, C.; FABRE, E.; BUREAU, M. F.; SCHERMAN, D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. **The Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. S1, p. S11-S23, 2004.

BUESCHER, E. S.; SMITH, R. R.; SCHOENBACH, K. H. Submicrosecond intense pulsed electric field effects on intracellular free calcium: mechanisms and effects. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 32, n. 4, p. 1563-1572, 2004.

CHANG, D. C. Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy. **Guide to Electroporation and Electrofusion**, p. 9-28, 1992.

CHANG, D. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. Academic Press, 1991.

CHIEA, R.; SUZUKI, D.; MARQUES, J. Simulacoes numericas de arranjos experimentais da eletroporacao em celulas biologicas. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – Porto de Galinhas/PE**, p. 351–354, 2012.

CHIEA, R. A. Preparação de um arranjo experimental para estudo da eletroporação em célula única. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

CHOPINET, L.; BATISTA-NAPOTNIK, T.; MONTIGNY, A.; REBERSEK, M.; TEISSIÉ, J.; ROLS, M. P.; MIKLAVČIČ, D. Nanosecond electric pulse effects on gene expression. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 11, p. 851-859, 2013.

DANI, S. The Challenge of Vector Development in Gene Therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.2, p. 133-45, 1999.

DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 3, p. 1213-1224, 1999.

DENG, J.; SCHOENBACH, K. H.; BUESCHER, E. S.; HAIR, P. S.; FOX, P. M.; BEEBE, S. J. The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 4, p. 2709-2714, 2003.

ELLIS, T. L.; GARCIA, P. A.; ROSSMEISL JR, J. H.; HENAO-GUERRERO, N.; ROBERTSON, J.; DAVALOS, R. V. Nonthermal irreversible electroporation for intracranial surgical applications: laboratory investigation. **Journal of Neurosurgery**, v. 114, n. 3, p. 681-688, 2011.

ESCOFFRE, J.-M.; TEISSIÉ, J.; ROLS, M.-P. Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? **The Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 1, p. 61-74, 2010.

FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P. Dielectric properties of tissues. **Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields**, v. 2, p. 25-102, 1995.

FOSTER, K. R. Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 28, n. 1, p. 15-23, 2000.

FREY, W.; WHITE, J.; PRICE, R.; BLACKMORE, P.; JOSHI, R.; NUCCITELLI, S.; BEEBE, S.; SCHOENBACH, K.; KOLB, J. Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 10, p. 3608–3615, 2006.

GALLINARO, J. V. Estudo de modelos matemáticos de fronteira móvel para aplicação em migração celular. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

GENG, T.; ZHAN, Y.; LU, C. Gene delivery by microfluidic flow-through electroporation based on constant DC and AC field. In: **2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**. IEEE, 2012. p. 2579-2582.

GOLZIO, M.; TEISSIÉ, J.; ROLS, M.-P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1292-1297, 2002.

GOTHELF, A.; MIR, L. M.; GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 5, p. 371-387, 2003.

GOWRISHANKAR, T. R.; ESSER, A. T.; VASILKOSKI, Z.; SMITH, K. C.; WEAVER, J. C. Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p. 1266-1276, 2006.

HABERL, S.; MIKLAVCIC, D.; SERSA, G.; FREY, W.; RUBINSKI, B. Cell Membrane Electroporation – Part 2: The Applications. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v.29, n.1, 2013.

HERWEIJER, H.; WOLFF, J. A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. **Gene Therapy**, v. 10, n. 6, p. 453-458, 2003.

HU, Q.; JOSHI, R. P.; SCHOENBACH, K. H. Simulations of nanopore formation and phosphatidylserine externalization in lipid membranes subjected to a high-intensity, ultrashort electric pulse. **Physical Review E**, v. 72, n. 3, p. 031902, 2005.

HU, Q.; JOSHI, R. P. Analysis of intense, subnanosecond electrical pulse-induced transmembrane voltage in spheroidal cells with arbitrary orientation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 56, n. 6, p. 1617-1626, 2009.

IVORRA, A.; VILLEMEJANE, J.; MIR, L. Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 34, p. 10055-10064, 2010.

JOSHI, R.; HU, Q.; SCHOENBACH, K. Modeling Studies of Cell Response to Ultrashort, High-Intensity Electric Fields - Implications for Intracellular Manipulation. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 32, n. 4, p. 1677-1686, 2004.

KAKORIN, S.; NEUMANN, E. Ionic conductivity of electroporated lipid bilayer membranes. **Bioelectrochemistry**, v. 56, n. 1, p. 163-166, 2002.

KANDUŠER, M.; MIKLAVČIČ, D.; PAVLIN, M. Mechanisms involved in gene electrotransfer using high-and low-voltage pulses—an in vitro study. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 2, p. 265-271, 2009.

KANER, A.; BRASLAVSKY, I.; RUBINSKI, B. Model of Pore Formation in a Single Cell in a Flow-Through Channel with Micro-Electrodes. **Biomed Microdevices**, v. 19, n.2, p. 181-189, 2014.

KOTNIK, T.; FREY, W.; SACK, M.; MEGLIC, S.; PETERKA, M.; MIKLAVCIC, D. Electroporation-based applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.33, n.8, 2015.

KOTNIK, T; MIKLAVCIC, D. Theoretical Evaluation of Voltage Inducement on Internal Membranes of Biological Cells Exposed to Electric Fields. **Biophysical Journal**, v. 90, n.2, p. 480-491, 2006.

KOTNIK, T. *et al.* Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 28, n. 5, p. 14-23, 2012.

LI, X.; WEI, Z.; ZHAO, D.; YAN, H.; LIANG, Z.; LI, Z. A flow-through electroporation chip integrated with viable cell sorting based on dielectrophoresis. In: **Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2012 IEEE 25th International Conference on**. IEEE, 2012. p. 993-996.

LODISH, H. Molecular cell biology. Macmillan, 2008.

LU, Q. L.; BOU-GHARIOS, G.; PARTRIDGE, T. A. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. **Gene Therapy**, v. 10, n. 2, p. 131-142, 2003.

MAGISTRETTRI, J.; MANTEGAZZA, M.; GUATTEO, E.; WANKE, E. Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine?. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 12, p. 530-534, 1996.

MAZZANTI, M.; BUSTAMANTE, J. O.; OBERLEITHNER, H. Electrical dimension of the nuclear envelope. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 1-19, 2001.

MERLA, C.; DENZI, A.; PAFFI, A.; CASCIOLA, M.; D'INZEO, G.; APOLLONIO, F.; LIBERTI, M. Novel passive element circuits for microdosimetry of nanosecond pulsed electric fields. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 59, n. 8, p. 2302-2311, 2012.

MIKLAVCIC, D.; TOWHIDI, L. Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells. **Radiology and Oncology**, v. 44, n. 1, p. 34-41, 2010.

MIKLAVCIC, D.; SERSA, G.; BRECELJ, E.; GEHL, J.; SODEN, D.; BIANCHI, G.; RUGGIERI, P.; ROSSI, C. R.; CAMPANA, L. G.; JARM, T. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 50, n. 12, p. 1213-1225, 2012.

MIR, L. M.; GEHL, J.; SERSA, G.; COLLINS, C. G.; GARBAY, J. R.; BILLARD, V.; MARTY, M. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the CliniporatorTM by means of invasive or non-invasive electrodes. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 4, n. 11, p. 14-25, 2006.

MOVAHED, S.; LI, D. A theoretical study of single-cell electroporation in a microchannel. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 2, p. 151-160, 2013.

MOVAHED, S.; BAZARGAN-LARI, Y.; DANESHMAD, F.; MASHHOODI, M. Numerical modeling of bi-polar (AC) pulse electroporation of single cell in microchannel to create nanopores on its

membrane. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1229-1237, 2014.

NAPOTNIK, T. B.; REBERŠEK, M.; KOTNIK, T.; LEBRASSEUR, E.; CABODEVILA, G.; MIKLAVČIČ, D. Electroporabilization of endocytotic vesicles in B16 F1 mouse melanoma cells. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 48, n. 5, p. 407-413, 2010.

NAPOTNIK, T. B.; REBERŠEK, M.; VERNIER, P. T.; MALI, B.; MIKLAVČIČ, D. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eucaryotic cells (in vitro): A systematic review. **Bioelectrochemistry**, v. 110, p. 1-12, 2016.

NEAL II, R. E.; DAVALOS, R. V. The feasibility of irreversible electroporation for the treatment of breast cancer and other heterogeneous systems. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2615-2625, 2009.

NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. **Physical Review E**, v.59, n.3, p. 3471, 1999.

NEUMANN, E.; ROSENHECK, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 10, n. 1, p. 279-290, 1972.

PAGANIN-GIOANNI, A.; BELLARD, E.; ESCOFFRE, J. M.; ROLS, M. P.; TEISSIE, J., GOLZIO, M. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10443-10447, 2011.

PAKHOMOV, A.; KOLB, J.; WHITE, J.; JOSHI, R.; XIAO, S.; SCHOENBACH, K. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). **Bioelectromagnetics**, v. 28, n. 8, p. 655–663, 2007.

PAVLIN, M.; MIKLAVČIČ, D. The effective conductivity and the induced transmembrane potential in dense cell system exposed and the induced transmembrane potential in dense cell system exposed to DC and AC electric fields. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 37, n.1, p. 99-106, 2009.

POLEVAYA, Y.; ERMOLINA, I.; SCHLESINGER, M.; GINZBURG, B.-Z.; FELDMAN, Y. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells: II. Normal and malignant white blood cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1419, n. 2, p. 257-271, 1999.

PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D.; KOTNIK, T. A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 56, n. 5, p. 1491-1501, 2009.

RAMOS, A. Effect of the Electroporation in the Field Calculation in Biological Tissues. **Artificial Organs**, v.29, n.6, p. 510-513, 2005.

RAMOS, A. Desenvolvimento do Método do Circuito Equivalente para a Análise Numérica de Processos Elétricos em Tecidos Biológicos. Florianópolis, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.

RAMOS, L. C. Estudo da condutividade elétrica de suspensões de células biológicas durante aplicação de campos elétricos intensos com microdispositivo. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

REBERŠEK, M.; MIKLAVČIČ, D. Advantages and disadvantages of different concepts of electroporation pulse generation. **Automatika—Journal for Control, Measurement, Electronics, Computing and Communications**, v. 52, n. 1, 2011.

REMS, L.; UŠAJ, M.; KANDUŠER, M.; REBERŠEK, M.; MIKLAVČIČ, D.; PUCIHAR, G. Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

RETELJ, L.; PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation of intracellular liposomes using nanosecond electric pulses—a theoretical study. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 60, n. 9, p. 2624-2635, 2013.

RUBINSKY, B. Irreversible electroporation in medicine. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 6, n. 4, p. 255-259, 2007.

SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN, S.; RASO, J. Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 11, p. 1415-1426, 2014.

SALIMI, E.; THOMSON, D. J.; BRIDGES, G. E. Membrane dielectric dispersion in nanosecond pulsed electroporation of biological cells. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 20, n. 4, p. 1256-1265, 2013.

SANTRA, T. S.; BORANA, J.; WANG, P. C.; TSENG, F. G. Nanoelectroporation and controllable intracellular delivery into localized single cell with high transfection and cell viability. In: **2014 IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)**. IEEE, 2014. p. 865-868.

SCHERTZER, J. D.; PLANT, D. R.; LYNCH, G. S. Optimizing plasmid-based gene transfer for investigating skeletal muscle structure and function. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 4, p. 795-803, 2006.

SCHOENBACH, K.; BEEBE, S.; BUESCHER, E. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. **Bioelectromagnetics**, v. 22, n. 6, p. 440-448, 2001.

SCHOENBACH, K. H.; HARGRAVE, S. J.; JOSHI, R. P.; KOLB, J. F.; NUCCITELLI, R.; OSGOOD, C.; XIAO, S. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 14, n. 5, p. 1088-1109, 2007.

SILVE, A.; LERAY, I.; POIGNARD, C.; MIR, L. Impact of external medium conductivity on cell membrane electroporomeabilization by microsecond and nanosecond electric pulses. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

SMITH, K. C.; GOWRISHANKAR, T. R.; ESSER, A. T.; STEWART, D. A.; WEAVER, J. C. The spatially distributed dynamic transmembrane voltage of cells and organelles due to 10 ns pulses: meshed transport networks. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1394-1404, 2006.

SMITH, K; WEAVER, J. Active Mechanisms are Needed to Describe Cell Responses to Submicrosecond, Megavolt-per-Meter Pulses: Cell Models for Ultrashort Pulses. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 4, p. 1547-1563, 2008.

STEWART, D. A.; GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. Transport lattice approach to describing cell electroporation: use of a local asymptotic model. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 32, n. 4, p. 1696-1708, 2004.

STANKEVIČ, V. *et al.* Electroporation system generating wide range square-wave pulses for biological applications. In: **2013 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)**. IEEE, 2013. p. 33-36.

SUKHORUKOV, V. L.; REUSS, R.; ZIMMERMANN, D.; HELD, C.; MÜLLER, K. J.; KIESEL, M.; ZIMMERMANN, U. Surviving high-intensity field pulses: strategies for improving robustness and performance of electrotransfection and electrofusion. **The Journal of Membrane Biology**, v. 206, n. 3, p. 187-201, 2005.

SUZUKI, D. O. H. Estudo da Condutividade Elétrica de Suspensões de Eritrócitos de Ratos Durante Aplicação de Campos Elétricos Intensos: Teoria, Modelagem e Experimentação. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SUZUKI, D; RAMOS, A.; RIBEIRO, M; CAZAROLLI, L.; SILVA, F; LEITE, L.; MARQUES, J. Theoretical and Experimental Analysis of Electroporated Membrane Conductance in Cell Suspension. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 58, n.12, 2011.

TALELE, S.; GAYNOR, P.; CREE, M. J.; VAN EKERAN, J. Modelling single cell electroporation with bipolar pulse parameters and dynamic pore radii. **Journal of Electrostatics**, v. 68, n. 3, p. 261-274, 2010.

TANG, Y.; CAO, G.; CHEN, X.; YOO, J.; YETHIRAJ, A.; CUI, Q. A finite element framework for studying the mechanical response of macromolecules: application to the gating of the mechanosensitive channel MscL. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 4, p. 1248-1263, 2006.

TEKLE, E.; OUBRAHIM, H.; DZEKUNOV, S. M.; KOLB, J. F.; SCHOENBACH, K. H.; CHOCK, P. B. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 1, p. 274-284, 2005.

VASILKOSKI, Z.; ESSER, A.; GOWRISHANKAR, T.; WEAVER, J. Membrane Electroporation: The Absolute Rate Equation and Nanosecond Time Scale Pore Creation. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 74, n. 2, p. 21904, 2006.

VERNIER, P. T.; SUN, Y.; MARCU, L.; CRAFT, C. M.; GUNDERSEN, M. A. Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. **FEBS Letters**, v. 572, n. 1-3, p. 103-108, 2004.

VERNIER, P. T.; SUN, Y.; MARCU, L.; CRAFT, C. M.; GUNDERSEN, M. A. Ultrashort pulsed electric fields induce membrane phospholipid translocation and caspase activation: differential sensitivities of Jurkat T lymphoblasts and rat glioma C6 cells. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 10, n. 5, p. 795-809, 2003.

WALTHER, W.; STEIN, U.; FICHTNER, I.; VOSS, C.; SCHMIDT, T.; SCHLEEF, M.; SCHLAG, P. M. Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer. **Molecular Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 105-115, 2002.

WANG, M.; ORWAR, O.; OLOFSSON, J.; WEBER, S. Single-cell electroporation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Springer, v. 397, n. 8, p. 3235-3248, 2010.

WU, M.; WEI, Z.; ZHAO, D.; LI, Z. A portable and high efficiency system for cell electroporation under low voltage. In: **Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS), 2011 IEEE International Conference on**. IEEE, 2011. p. 768-771.

WU, M.; ZHAO, D.; YAN, H.; LIANG, Z.; LI, Z. A symmetrical hyperbolic formatted microchip for rapid optimization of electroporation. In: **Nano/Micro Engineered and Molecular Systems**

(NEMS), 2013 8th IEEE International Conference on IEEE, 2013. p. 312-315.

YANG, R.; TARN, T.-J.; ZHANG, M. Data-driven feedforward control for electroporation mediated gene delivery in gene therapy. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 18, n. 4, p. 935-943, 2010.

YAO, C.; HU, X.; MI, Y.; LI, C.; SUN, C. Window effect of pulsed electric field on biological cells. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 16, n. 5, p. 1259-1266, 2009.

Anexo A – Dados de Raios e Espessuras

Tipos de Células	Raios		Espessuras	
	$R_c (m)$	$R_n (m)$	$d_c (m)$	$d_n (m)$
Células B Normais ¹	$3,3 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células B Neoplásicas ¹	$5,2 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células Teóricas ²	10×10^{-6}	3×10^{-6}	5×10^{-9}	10×10^{-9}
Células B16-F1 ³	$11,4 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-6}$	5×10^{-9}	10×10^{-9}
Linfócitos ⁴	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células B Normais ⁵	$3,3 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células Magala ⁵	$5,3 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células Farage ⁵	$5,2 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células Raji ⁵	$6,4 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células BJAB ⁵	$6,3 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células Daudi ⁵	$6,8 \times 10^{-6}$	$5,7 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células T Normais ⁵	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células T Peer ⁵	$5,1 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Células T HDMAR ⁵	$5,9 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Valor Mínimo	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$	5×10^{-9}	10×10^{-9}
Valor Máximo	11×10^{-6}	$7,3 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}
Valor Médio*/Padrão**	$5,75 \times 10^{-6}$	$4,24 \times 10^{-6}$	7×10^{-9}	40×10^{-9}

¹JOSHI *et al*, 2004

²RETELJ *et al*, 2013

³REMS *et al*, 2013

⁴ASAMI *et al*, 1989

⁵POLEVAYA *et al*, 1999

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de raios.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de espessuras.

Anexo B – Dados de Condutividades Eléctricas

Tipos de Células	Condutividades			
	$\sigma_{cit} (S/m)$	$\sigma_{np} (S/m)$	$\sigma_{mp_0} (S/m)$	$\sigma_{mn_0} (S/m)$
Células B Normais ¹	1,31	2,04	56×10^{-6}	$11,1 \times 10^{-3}$
Células B Neoplásicas ¹	0,48	1,07	$9,1 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-3}$
Células Teóricas ²	0,48	1,07	$0,31 \times 10^{-7}$	10×10^{-6}
Células B16-F1 ³	0,25	0,5	$0,5 \times 10^{-6}$	100×10^{-6}
Linfócitos ⁴	0,36	2,2	$3,6 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-3}$
Células B Normais ⁵	1,31	2,04	56×10^{-6}	$11,1 \times 10^{-3}$
Células Magala ⁵	0,55	1,08	$8,8 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-3}$
Células Farage ⁵	0,48	1,07	$9,1 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-3}$
Células Raji ⁵	0,58	1,02	$8,2 \times 10^{-6}$	4×10^{-3}
Células BJAB ⁵	0,88	1,39	11×10^{-6}	$2,1 \times 10^{-3}$
Células Daudi ⁵	0,85	1,44	$9,5 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-3}$
Células T Normais ⁵	0,65	1,26	$27,4 \times 10^{-6}$	$8,8 \times 10^{-3}$
Células T Peer ⁵	0,81	1,42	$12,9 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-3}$
Células T HDMAR ⁵	0,88	1,58	$14,5 \times 10^{-6}$	3×10^{-3}
Valor Mínimo	0,25	0,5	$0,31 \times 10^{-7}$	10×10^{-6}
Valor Máximo	1,31	2,2	56×10^{-6}	$11,1 \times 10^{-3}$
Valor Médio*	0,72	2,05	$16,2 \times 10^{-6}$	$4,42 \times 10^{-3}$

¹JOSHI *et al*, 2004;

²RETELJ *et al*, 2013

³REMS *et al*, 201

⁴ASAMI *et al*, 1989

⁵POLEVAYA *et al*, 1999

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores.

Anexo C – Dados de Permissividades Relativas

Tipos de Células	Permissividades relativas			
	ε_{cit}	ε_{np}	ε_{mp}	ε_{mn}
Células B Normais ¹	60	120	12,8	106
Células B Neoplásicas ¹	60	120	9,8	60,3
Células Teóricas ²	72,3	72,3	5	10
Células B16-F1 ³	70	70	4,5	7
Linfócitos ⁴	60	32	6,8	32
Células B Normais ⁵	60	120	12,8	106
Células Magala ⁵	60	120	11,4	72,5
Células Farage ⁵	60	120	9,8	60,3
Células Raji ⁵	60	120	8,8	79,9
Células BJAB ⁵	60	120	8	108
Células Daudi ⁵	60	120	7,2	66,1
Células T Normais ⁵	60	120	11,1	85,6
Células T Peer ⁵	60	120	9,5	61,6
Células T HDMAR ⁵	60	120	7,4	101,2
Valor Mínimo	60	32	4,5	7
Valor Máximo	72,3	120	12,8	108
Valor Médio *Padrão **	60	120	8,92	68,32

¹JOSHI *et al*, 2004

²RETELJ *et al*, 2013

³REMS *et al*, 2013

⁴ASAMI *et al*, 1989

⁵POLEVAYA *et al*, 1999

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores de permissividades das membranas.

**Valor padrão obtido pela predominância de valores de permissividades do citoplasma e nucleoplasma.

Anexo D – Dados de Capacitâncias e Condutâncias

Tipos de Células	Capacitâncias		Condutâncias	
	C_{mp}	C_{mn}	G_{mp}	G_{mn}
Células B Normais ¹	0,016191	0,023464	8000	277500
Células B Neoplásicas ¹	0,012396	0,013348	1300	110000
Células Teóricas ²	0,006324	0,002214	62	1000
Células B16-F1 ³	0,007969	0,006198	100	10000
Linfócitos ⁴	0,012042	0,028333	514,28	112500
Células B Normais ⁵	0,016191	0,023464	8000	277500
Células Magala ⁵	0,014420	0,016048	1257,14	92500
Células Farage ⁵	0,012396	0,013348	1300	110000
Células Raji ⁵	0,011131	0,017686	1171,42	100000
Células BJAB ⁵	0,010119	0,023906	1571,42	52500
Células Daudi ⁵	0,009107	0,014632	1357,14	67500
Células T Normais ⁵	0,014040	0,018948	3914,28	220000
Células T Peer ⁵	0,012016	0,013635	1842,85	52500
Células T HDMAR ⁵	0,009360	0,022401	2071,42	75000
Valor Mínimo	0,006324	0,002214	62	1000
Valor Máximo	0,016191	0,028333	8000	277500
Valor Médio*	0,01169	0,01697	2318,714	111321,4

¹JOSHI *et al*, 2004

²RETELJ *et al*, 2013

³REMS *et al*, 2013

⁴ASAMI *et al*, 1989

⁵POLEVAYA *et al*, 1999

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores.

Anexo E – Tempo de Carregamento das Membranas

Tipos de Células	$\tau_{mp}(ns)$	$\tau_{mn}(ns)$	Razão τ_{mp}/τ_{mn}
Células BJAB ⁵	95	106	0,904
Células T HDMAR ⁵	87	90	0,961
Células Raji ⁵	108	97	1,101
Linfócitos ⁴	96	86	1,116
Células Daudi ⁵	87	67	1,295
Células Magala ⁵	134	79	1,684
Células B Neoplásicas ¹	116	68	1,690
Células Farage ⁵	116	68	1,694
Células T Normais ⁵	112	62	1,800
Células T Peer ⁵	108	53	2,024
Células B16-F1 ³	87	37	2,304
Células B Normais ⁵	122	47	2,563
Células Teóricas ²	59	11	5,199
Células B Normais ¹	267	34	7,826
Valor Mínimo	59	11	0,904
Valor Máximo	267	106	7,826
Valor Médio *	113,85	59,78	2,29775

Tempo de carregamento calculado para $\sigma_{sol} = 0,1S/m$ e demais dados correspondentes a cada célula descrita nos Anexos anteriores.

¹JOSHI *et al*, 2004

²RETELJ *et al*, 2013

³REMS *et al*, 2013

⁴ASAMI *et al*, 1989

⁵POLEVAYA *et al*, 1999

*Valor médio obtido pela média aritmética entre os valores.

Anexo F – Faixa de Variação dos Parâmetros e Valores Padrões

Parâmetro	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Padrão
$\sigma_{np}(S/m)^1$	0,1	1	0,3
$\varepsilon_{np}(F/m)^1$	$3,5 \times 10^{-10}$	7×10^{10}	$6,4 \times 10^{-10}$
$\sigma_{mn}(S/m)^1$	10^{-8}	10^{-5}	3×10^{-7}
$\varepsilon_{mn}(F/m)^1$	$1,88 \times 10^{-11}$	$8,8 \times 10^{-11}$	$4,4 \times 10^{-11}$
$\sigma_{cit}(S/m)^1$	0,1	1	0,3
$\varepsilon_{cit}(F/m)^1$	$3,5 \times 10^{-10}$	7×10^{-10}	$6,4 \times 10^{-10}$
$\sigma_{mp}(S/m)^1$	10^{-8}	10^{-6}	3×10^{-7}
$\varepsilon_{mp}(F/m)^1$	$1,8 \times 10^{-11}$	$8,8 \times 10^{-11}$	$4,4 \times 10^{-11}$
$\sigma_e(S/m)^1$	—	—	1,2
$\varepsilon_e(F/m)^1$	—	—	$6,4 \times 10^{-10}$
$R_n(\mu m)^1$	1	8	3
$d_{mn}(nm)^1$	3	15	5
$R_c(\mu m)^1$	5	100	10
$d_{mp}(nm)^1$	3	7	5
$C_{mp}(\mu F/cm^2)^2$	—	—	1
$C_{mn}(\mu F/cm^2)^2$	—	—	0,5

¹KOTNIK e MIKLAVCIC, 2006

²SCHOENBACH *et al.*, 2001

Anexo G – Parâmetros do Modelo Matemático da Eletroporação

Parâmetros do modelo	q	α (m^2s^{-1})	N_0 (m^{-2})	V_{ep} (mV)	w_0	η	r_p (nm)	T (K)	σ_p (S/m)
Dados ¹	1	10^9	$3,3 \times 10^6$	224	3,2	0,15	0,8	295	1,2
Dados ²	1	10^9	$3,3 \times 10^6$	224	3,2	0,15	0,8	300	—
Dados ³	2,46	10^9	$1,5 \times 10^9$	170	2,65	0,15	0,8	295	0,16
Dados ⁴	2,46	10^9	$1,5 \times 10^9$	258	2,65	0,15	0,76	295	1,2
Dados ⁵	2,46	10^9	$1,5 \times 10^9$	258	2,65	0,15	0,76	295	1,3
Dados ⁶	2,46	10^9	$1,5 \times 10^9$	258	-	-	0,76	-	-
Dados ⁷	1	$0,08 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	180	3,1	0,15	0,8	310	1,2
Dados ⁸	2,46	10^6	$1,5 \times 10^9$	258	2,65	0,15	0,76	295	1,3
Dados ⁹	-	10^9	$3,3 \times 10^6$	-	3,1	0,15	0,8	300	1,2
Dados ¹⁰	2,46	10^9	$1,5 \times 10^9$	258	2,65	0,15	0,76	300	0,5
Dados ¹¹	—	10^9	10^9	258	—	—	0,55	300	2
Dados ¹²	—	10^9	$1,5 \times 10^9$	258	—	—	0,51	310	2
Dados ¹³	—	10^9	10^9	258	—	—	0,51	300	2
Dados ¹⁴	—	10^{10}	$1,5 \times 10^9$	200	—	—	0,8	310	0,6

Parâmetros do modelo	q	α (m^2s^{-1})	N_0 (m^{-2})	V_{ep} (mV)	w_0	η	r_p (nm)	T (K)	σ_p (S/m)
Valor mínimo	1	0,08 $\times 10^6$	0,8 $\times 10^6$	170	2,65	0,15	0,51	295	0,16
Valor máximo	3,48	10^{10}	1,5 $\times 10^9$	258	3,2	0,15	0,8	310	2
Valor padrão	2,46	10^9	1,5 $\times 10^9$	258	2,65	0,15	0,8	300	1,2

¹SALIMI *et al.*, 2013
²SMITH e WEAVER, 2008
³PUCHIAR *et al.*, 2009
⁴TALELE, 2010
⁵RETELJ *et al.*, 2013
⁶REMS *et al.*, 2013
⁷GOWRISHANKAR *et al.*, 2006
⁸DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999
⁹SMITH *et al.*, 2006
¹⁰STEWART, 2004
¹¹MOVAHED *et al.*, 2014
¹²YANG *et al.*, 2010
¹³MOVAHED e LI, 2013
¹⁴CHIEA *et al.*, 2012

Anexo H – Parâmetros para Validação do Modelo Matemático Implementado no COMSOL

Parâmetros	RETELJ <i>et al.</i> , 2013
q	2,46
$\alpha \text{ (m}^2\text{s}^{-1}\text{)}$	10^9
$N_0 \text{ (m}^{-2}\text{)}$	$1,5 \times 10^9$
$V_{ep} \text{ (mV)}$	258
w_0	2,65
η	0,15
$r_p \text{ (nm)}$	0,8
$k \text{ (m}^2\text{kg s}^{-2}\text{K}^{-1}\text{)}$	$1,38 \times 10^{-23}$
$T \text{ (K)}$	295
$\sigma_p \text{ (S/m)}$	1,3
$\sigma_{np} \text{ (S/m)}$	1
$\sigma_{mn} \text{ (S/m)}$	1×10^{-4}
ε_{mn}	10
$\sigma_{cit} \text{ (S/m)}$	0,5
$\varepsilon_{np} = \varepsilon_{cit} = \varepsilon_e$	72,3
$\sigma_{mp} \text{ (S/m)}$	3×10^{-7}
ε_{mp}	5
$\sigma_e \text{ (S/m)}$	1,2
$R_n \text{ (}\mu\text{m)}$	3
$d_{mn} \text{ (nm)}$	10
$R_c \text{ (}\mu\text{m)}$	10
$d_{mp} \text{ (nm)}$	5

